

# **Strukturelle und funktionelle Analyse von chromosomalen Domänen mit Hilfe sequenz- spezifischer Rekombination in *Drosophila***

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Diplom-Biologe Thomas Zielke

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekanin/Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. Harald Saumweber  
                         2. Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray  
                         3. Prof. Dr. Achim Leutz

Tag der mündlichen Prüfung:      28.05.2015

1. Einleitung.....	7
1.1 Das Chromatin.....	7
1.1.1 Das Nukleosom.....	8
1.1.2 Histon-Code-Hypothese.....	10
1.1.3 Höhere Verpackungsgrade.....	13
1.1.3.1 Die 30 nm Faser.....	13
1.1.3.2 Die Schleifendomäne.....	15
1.1.3.3 Domänengrenzen.....	17
1.1.3.4 Offenes Chromatin.....	19
1.2 Polytäne Chromosomen.....	23
1.3 Funktionelle Organisation in polytänen und diploiden Chromosomen.....	27
1.4 $\Phi$ C31 Sequenz-spezifische Rekombination.....	29
1.5 Gegenstand der Arbeit.....	33
 2. Materialien und Methoden.....	 34
2.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	34
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	34
2.1.2 Oligonucleotide.....	34
2.1.3 Antikörper.....	36
2.1.4 Bakterienstämme.....	37
2.1.5 Fliegenstämme.....	37
2.2 Konstruktion von Plasmidvektoren.....	39
2.2.1 Konstruktion von pUAST-NattBw.....	39
2.2.2 Konstruktion von pattP61Cdp.....	39
2.2.3 Konstruktion von pattP61C $\Delta$ d und pattP61C $\Delta$ p.....	40
2.2.4 Konstruktion von pattP61C $\Delta$ P1, pattP61C $\Delta$ P2 und pattP61C $\Delta$ P1+2.....	40
2.2.5 Konstruktion von pattP3C und pattP3C $\Delta$ fa(swb).....	40
2.2.6 Konstruktion von pattPNw-co und pattPempty-co.....	41
2.3 Anzucht und Haltung der Fliegen.....	41
2.4 P-Element vermittelte und $\Phi$ C31 vermittelte Keimbahntransformation.....	42
2.5 Herstellung von Quetschpräparaten polytäner Chromosomen.....	42
2.6 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) von Polytänchromosomen.....	42
2.7 Immunmarkierung von Polytänchromosomen.....	43

2.8 Isolation von Gesamt-RNA und quantitative RT-PCR.....	44
2.9 modENCODE Analyse.....	44
3. Ergebnisse.....	45
3.1 Etablierung einer kondensierten Chromatin-Domäne mit interner attB-Rekombinationssequenz.....	45
3.1.1 Der P-Element Vektor integriert an vielen Stellen im Genom.....	47
3.1.2 Die P-Element Vektoren integrieren präferentiell in offenes Chromatin und bilden ektopische Banden.....	49
3.2 Gezielte Rekombination attP gekoppelter Interbanden-Sequenzen in die ektopische Bande erzeugt offenes Chromatin .....	51
3.2.1 DNA-Sequenzen lassen sich mit dem $\Phi$ C31-Rekombinations-system ortsspezifisch in die Zielregion integrieren.....	53
3.2.2 Integration von Interbanden-DNA öffnet die kondensierte Chromatindomäne.....	54
3.2.3 Die Chromatinstruktur der ektopischen Interbandenregion ist ähnlich der Struktur am endogenen Locus.....	56
3.2.4 Die bei der Rekombination genutzten Reportergene tragen nur nach Induktion zur dekondensierten Chromatinstruktur bei.....	59
3.3 Identifizierung essentieller Sequenzen zur Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierten Chromatins.....	61
3.3.1 Deletion essentieller Sequenzabschnitte von 61C7/8 und 3C6/7 führt zum Verlust der Fähigkeit offenes Chromatin zu bilden.....	61
3.3.2 Die Fähigkeit zur Bildung dekondensierten Chromatins geht einher mit der Bindung spezifischer Proteine .....	64
3.3.3 Ein 490 bp Element mit Promoterfunktion in der proximalen Region der 61C7/8 Interbande ist essentiell für die Bildung von dekondensiertem Chromatin.....	66
3.3.4 Die Promoter 1 Deletion zieht den Verlust der Bindung von Chromatinproteinen nach sich.....	68
3.3.5 Die Deletion von Promoter 1 als auch von Promoter 2 führt zu einer deutlichen Reduktion der Transkription.....	69

4. Diskussion.....	71
4.1 Das molekulare Profil des Chromatins definiert auch dessen strukturelle Organisation.....	71
4.2 Die 61C7/8 Interbande weist eine deutlich größere Ausdehnung auf als angenommen.....	74
4.3 Banden und Interbanden stellen autonome Einheiten in polytären Chromosomen von <i>Drosophila</i> dar.....	77
4.4 Ektopisch gebildetes Interbandenchromatin besitzt eine ähnliche Chromatinstruktur und transkriptionelle Aktivität wie der endogene Locus.....	80
4.5 Die Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierten Chromatins bedarf lokal begrenzter Regionen innerhalb einer Interbande.....	83
4.6 Die strukturelle Integrität der 61C7/8 Interbande wird durch einen polaren Effekt innerhalb des proximalen Fragments aufrechterhalten.....	89
4.7 Ausblick.....	91
5. Zusammenfassung.....	94
6. Literaturverzeichnis.....	96
7. Anhang.....	109
8. Abkürzungsverzeichnis.....	111

## Abstract:

Polytäre Riesenchromosomen von *Drosophila melanogaster* bieten ein ideales Modellsystem für die Untersuchung der Mechanismen zur strukturellen Bildung chromosomaler Domänen. Über Manipulation und Rekonstruktion des chromosomalen Bandenmusters polytärer Chromosomen können artifiziell kondensierte als auch dekonensierte Domänen etabliert werden. Diese Eigenschaft habe ich in meiner Arbeit genutzt für die Etablierung eines experimentellen Systems zur Analyse der strukturellen Voraussetzungen zur Bildung offener Chromatindomänen. Dafür wurde eine transgene kondensierte Chromatindomäne ektopisch innerhalb offenen Chromatins generiert. Diese kondensierte „Modellbande“ bietet einen definierten genetischen Hintergrund für die gezielte Insertion von DNA-Sequenzen unter Ausschluss variabler Positionseffekte und ermöglicht dadurch eine vergleichende Analyse dieser Sequenzen auf ihr Vermögen offenes Chromatin zu bilden. Zu diesem Zweck wurde über Sequenz-spezifische Rekombination die 61C7/8 Interbandensequenz gezielt in die „Modellbande“ eingefügt. Die zytogenetische Untersuchung dieser Insertion zeigt, dass infolge der Insertion offenes Chromatin gebildet wird, was in einer Aufspaltung der kondensierten „Modellbande“ resultiert. Molekulare Analysen weisen darauf hin, dass auch die epigenetischen Charakteristika wie z.B. die Rekrutierung typischer Proteine oder transkriptionelle Eigenschaften zur endogenen Domäne imitiert werden. Über Deletionsanalysen konnte von mir die essentielle DNA-Sequenz zur Bildung offenen Chromatins auf ein ~490bp großes Fragment im proximalen Bereich der 61C7/8 Sequenz kartiert werden. Dieses Fragment überlappt mit Bindungsstellen spezifischer Proteine, welche dafür bekannt sind eine Rolle in der chromosomalen Domänenbildung zu spielen wie z.B. das Chromatin-Protein Chriz, die Histon-Kinase Jil1 oder das Insulator-Protein CP190. Desweiteren überlappt es mit einer Promoter-region, welche zwischen den Genen Rev1 und Med30 lokalisiert ist.

## Schlagworte:

polytäre Chromosomen, Interphase Chromatin, Chriz, Jil1, CP190

## Abstract:

Polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* provides an ideal model-system for the analysis of the mechanisms needed for chromosomal domain formation. Condensed as well as decondensed chromosomal domains can be formed by manipulating and reconstructing the polytene banding pattern. This possibility i have used for the establishment of an experimental system to study the structural requirements for open chromatin formation. Therefor i have generated a condensed chromatin domain at ectopic positions. This condensed „model“ domain provides a defined genetic context for the targeted insertion of sequences of interest, excluding any variable position effects. This allows comarative analysis of different sequences in order to identify the structural requirements for open chromatin formation. For this purpose the 61C7/8 interband sequence was targetly integrated into the condensed „model“ domain by site-specific recombination. Thereby i could show that the 61C7/8 interband sequence maintains the capacity to form open chromatin cognizable by the splitting of the condensed „model“ domain. Furthermore the newly formed open chromatin domain also keeps epigenetic characteristics like transcriptional activity or the recruitment of typical proteins. By deletion analysis, i have mapped the essential region needed for open chromatin formation to a ~490bp fragment located in the proximal part of the 61C7/8 interband sequence. This fragment overlaps binding sites for characteristic proteins known to be involved in chromosomal domain formation like the chromatin protein Chriz, the histone kinase Jil1 or the insulator protein CP190. Furthermore the fragment overlaps a promoter region that locates between the Rev1 and Med30 genes.

## Keywords:

polytene chromosomes, interphase chromatin, Chriz, Jil1, CP190

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Chromatin

In der eukaryotischen Zelle bildet die DNA durch Assoziation mit RNA und Proteinen eine komplexe Struktur, welche sich als ein hierarchisch organisierter Aufbau unterschiedlicher Verpackungsgrade beschreiben lässt. Aufgrund ihrer Anfärbbarkeit mit basischen Kernfarbstoffen, wurde diese Struktur als Chromatin bezeichnet (*chroma* = Farbe). Ein Grund für die Verpackung des Chromatins liegt darin, dass DNA-Moleküle typischer eukaryotischer Zellen sehr lang sind. So erreicht das menschliche Genom in der B-Konformation mit  $3,2 \times 10^9$  Basenpaaren (haploid) eine Länge von  $3,2 \times 10^9 \text{ bp} \times 3,4 \times 10^{-10} \text{ m} = 1,09 \text{ m}$ . Auch wenn das Genom auf insgesamt 23 Chromosomen aufgeteilt wird, könnte die DNA in gefalteten Zustand nicht in den Zellkern mit einem Durchmesser von  $\varnothing 5\text{-}16 \text{ }\mu\text{m}$  passen. Allein aus diesem Grund muss die DNA auf das  $\sim 10.000$  fache ihrer eigentlichen Länge kompaktiert werden. Neben sterischen Gründen spielt die DNA-Verpackung auch eine Rolle bei der Kontrolle der genomischen Aktivitäten. Die DNA im Zellkern ist infolge ihrer Verpackung nicht frei zugänglich für die Bindung von Enzymen und Kofaktoren. Um dynamische zelluläre Prozesse wie Replikation, Transkription, Rekombination oder DNA-Reparatur zu gewährleisten muss die Verpackung des Chromatins geändert werden (Lemaitre et al., 2005). Eine regulierte Änderung der Verpackung bewirkt, dass lokal blockierte Abschnitte der DNA geöffnet und somit für die Bindung relevanter Faktoren freigegeben werden. Auf der anderen Seite bewirkt kompaktes Chromatin die transkriptionelle Inaktivierung von Genen, welche zu spezifischen Entwicklungszeiten bzw. in bestimmten Geweben nicht notwendig oder sogar störend sind oder als chromosomale Strukturen wie das Zentromer oder das Telomer dauerhaft inaktiv gehalten werden müssen (Knezetic und Luse, 1986; Lorch et al., 1987).

Neben der Verpackung wird die Zugänglichkeit der DNA für Proteine auch durch die Konformation und Topologie bestimmt. Infolge der Chromatinverpackung entstehen lokale Krümmungen der DNA und Veränderungen des „Twist“ der DNA, die entweder Proteinbindungen begünstigen oder blockieren können. Die DNA-Sequenz selbst kann solche topologischen Veränderungen entweder lokal fördern oder verhindern (Kornberg und Lorch, 1999). Am Beispiel der Lac-Operator DNA-Sequenz konnte dieser Zusammenhang einer Proteinbindung in Abhängigkeit von der DNA-

Konformation mittels Co-Kristallographie experimentell nachgewiesen werden (Friedman et al., 1995). Die Lac-Operator Sequenz weist eine spezifisch gebogene Konformation auf. In Abwesenheit des „Effektors“ kann das dimere Lac-Repressormolekül optimal an die zwei Bindestellen der gekrümmten Lac-Operator DNA-Sequenz binden. Der „Effektor“ bewirkt eine Konformationsänderung des Lac-Repressor-Dimers, welches daraufhin nicht mehr in der Lage ist an die gekrümmte DNA zu binden.

Eine gebräuchliche Unterteilung des Chromatins hinsichtlich dessen Verpackung ist die Unterscheidung von Heterochromatin und Euchromatin. Das Heterochromatin wurde bereits von den Zytologen des 19. Jahrhunderts beschrieben, als Strukturen im Zellkern welche mittels basischer Kernfarbstoffe angefärbt werden können (Heitz, 1926). Heterochromatin interagiert mit der Kernhülle und ist demzufolge häufig an der Kernperipherie lokalisiert. Desweiteren beinhaltet es, im Gegensatz zu Euchromatin, überwiegend transkriptionell inaktive DNA-Regionen. Heterochromatin kann in zwei unterschiedliche Typen aufgeteilt werden, das konstitutive (KH) und das fakultative Heterochromatin (FH). Das KH ist immer sehr kompakt und angereichert an repetitiven, Gen-armen und spät replizierenden DNA-Sequenzen (Woodcock und Ghosh, 2010). Das Zentromer und das Telomer besteht beispielsweise hauptsächlich aus KH. Dagegen stellt das FH eine Struktur dar, die abhängig vom Zelltyp oder Geschlecht ausgebildet wird (Trojer und Reinberg, 2007). Ein typisches Beispiel für FH stellt ist das X-Chromosom bei Säugern, von dem in den weiblichen Tieren eine Kopie euchromatisch, die andere heterochromatisch vorliegt.

Die aus den beschriebenen Gründen notwendige Kompaktierung der DNA erfolgt in hierarchisch aufeinander aufbauenden Strukturen, wobei das Nukleosom die erste Stufe der Verpackung darstellt.

### 1.1.1 Das Nukleosom

Den Hauptteil, über 50% der Proteine im Zellkern, bilden die evolutionär hoch konservierten Core-Histone H2A, H2B, H3 und H4 und das weniger konservierte linker Histon H1. Diese Histon-Proteine sind in der Lage an die DNA zu binden und deren negative Ladung zu neutralisieren (Strick et al., 2001). Ein Komplex der Kern-Histone bildet das Grundgerüst der Nukleosomen, welche eine Kompaktierung um den Faktor sechs ermöglichen. Durch Interaktion spezifischer  $\alpha$ -Helices innerhalb der Histon-



Proteine bilden sich zuerst H2A/H2B- bzw. H3/H4-Heterodimere. Die H3/H4 Dimere bilden anschließend über Interaktion der C-terminalen H3- $\alpha$ -Helix ein stabiles Tetramer, welches als zentrale Struktur die H2A/H2B Dimere bindet und somit den Oktamer-Kern ausbildet. Der positiv geladene Oktamer-Kern des Nukleosoms wird von einem negativ geladenen 146 bp (bzw. 147 bp nach Davey et al., 2002; Luger, 2003) langen superhelikalen DNA-Abschnitt 1,65 mal umwunden (Luger et al., 1997; Kornberg und Lorch, 1999). Der Histon-Kern bietet dabei insgesamt 14 Kontaktstellen für die Interaktion mit der DNA (Luger, 2003).

Ein 0-80 bp langer „linker“-DNA-Abschnitt verbindet die benachbarten Nukleosomen zu einer 10 nm Kette („beads on a string“). Das sogenannte „linker“-Histon H1 befindet sich am Eingang und Ausgang der um den Histonkern gewundenen DNA und bedeckt und schützt die DNA im linker-Bereich auf eine Länge von ~20 bp vor Nukleaseverdau (Woodcock und Ghosh, 2010). Die exakte Rolle dieses Histons ist bis heute nicht im Detail verstanden. Das linker Histon ist wie bereits erwähnt in der Evolution weniger konserviert als die Kernhistone. Bei Vögeln existieren verschiedene H1 Varianten (H1, H1<sup>o</sup>, H5). Schließlich gibt es Organismen wie z.B. *S. cerevisiae*, die dieses Histon-Protein gar nicht besitzen. Es wird vermutet, dass H1 eine Rolle bei der Etablierung höherer Verpackungsstufen spielt (Bednar et al., 1998; siehe 1.1.3).

Mittels der Röntgenkristallographie und Elektronenmikroskopie konnte die Struktur des Nukleosoms inzwischen mit atomarer Auflösung dargestellt werden (Finch et al., 1977; Davey et al., 2002). Neben der elektronenmikroskopischen Analyse war es auch historisch von Bedeutung mittels biochemischer Prozesse das Nukleosom zu untersuchen. Mit Hilfe der Micrococcus Nuklease kann das Chromatin gespalten werden. Infolge der eingeschränkten Zugänglichkeit der um dem Oktamer-Kern gewundenen DNA, kann die Nuklease vor allem innerhalb der linker DNA enzymatisch schneiden. Dies führt in Abhängigkeit der Dauer der Reaktion als auch der Konzentration der Nuklease zu Spaltprodukten der Nukleosomenkette unterschiedlicher Größe (Mono-, Di-, Tri-Nukleosomen u.s.w.), welche mittels Sucrose Gradienten-Zentrifugation aufgetrennt werden können (van Holde et al., 1975; Noll und Kornberg, 1977). Die an dem jeweiligen Nukleosomen-Fragment gebundene DNA kann mit Hilfe der Gelelektrophorese und anschließender DNA-Färbung analysiert werden. Die Zugänglichkeit von nukleosomaler DNA ist nicht in jedem Fall dauerhaft für die Bindung von Proteinen blockiert. Es ist bekannt, dass durch Verschieben oder Entfernen von Nukleosomen, DNA-Sequenzen innerhalb der Nukleosomen freigesetzt

werden. Dies erfolgt mit Hilfe energieabhängiger Prozesse unter Verwendung sogenannter „Remodeller“ wie z.B. des SWI/SNF-Komplex (Becker und Horz, 2002; Becker, 2002). Die notwendige Energie dieses Prozesses wird durch die Hydrolyse von ATP bereit gestellt. Die Rekrutierung dieser Remodeller-Komplexe erfolgt durch Assoziation mit Sequenz-spezifischen DNA-Binde-faktoren (Natarajan et al., 1999). Gegenwärtig werden zwei verschiedenen Modelle zur dynamischen Ausbildung von Proteinkontakten propagiert. Das erste Modell beschreibt eine Verschiebung der Nukleosomen entlang der DNA infolge einer temporären Änderung der lokalen DNA-Spannung. Das zweite Modell beschreibt einen lokalen Kontaktverlust zwischen nukleosomaler DNA und Nukleosom, woraufhin es zur Bildung einer kleinen DNA Wölbung kommt. Beide Modelle resultieren darin, dass Proteine in zuvor blockierten Bereichen des Nukleosoms binden können und somit regulatorisch in zellulären Prozessen wirken können. Aufgrund dieser Dynamik wird auch der Begriff von „atmenden“ Nukleosomen verwendet (Pennings et al., 1991). Mit Hilfe von Dnase Verdau gekoppelt mit „indirect end labeling“ oder Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) kann die Dynamik der Nukleosomen-Positionierung experimentell analysiert werden.

Die nukleosomalen Histonproteine besitzen neben ihrer Rolle bei der DNA-Verpackung auch eine wichtige Bedeutung als epigenetischer Informationsspeicher und wirken direkt an biologischen Prozessen mit. Dies erfolgt insbesondere über die Etablierung verschiedener Histonmodifikationen bzw. Den Einbau von Histonvarianten, welche wiederum die lokale DNA-Bindung von Proteinen und Enzymkomplexen beeinflussen.

### 1.1.2 Histon-Code-Hypothese

Infolge verschiedener posttranslationaler Modifizierungen der N- und C-terminalen Arme von Core-Histon-Proteinen, wie zum Beispiel Methylierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitylierung, Glycosylierung, Biotinylierung und Sumoylierung (van Holde, 1988) entstehen spezifisch modifizierte Nukleosomen. Deren regulatorische Bedeutung wird durch die sogenannte epigenetische „Histon-Code-Hypothese“ beschrieben (Jenuwein und Allis, 2001). Diese postuliert, dass unterschiedliche Histonmodifizierungen (einzeln oder in Kombination) entweder direkt oder über die Rekrutierung von spezifischen Proteinen und Enzymkomplexen eine Änderung der Chromatinstruktur bewirken, was sich dann in einer Zunahme bzw. Abnahme des Kon-

densierungsgrades widerspiegelt (Strahl und Allis, 2000). Dies wiederum ermöglicht eine spezifische Zugänglichkeit von regulatorischen DNA-Elementen für z.B. die Transkriptionsmaschinerie (Park et al., 2002). Nach neueren Erkenntnissen werden auch Aminosäurereste in internen globulären Regionen von Histonen modifiziert. Man vermutet, dass solche Modifikationen einen deutlichen Einfluss auf die Struktur der Histone und damit der Stabilität der Nukleosomen ausüben. Indem eine Vielzahl unterschiedlicher Histonmodifikationen ausgebildet werden und voneinander abhängig sein können ergibt sich eine enorme Vielfalt an kombinatorischen Mustern (Strahl und Allis, 2000; Turner, 2000). Aus diesem Grund bietet der Histon-Code einen sehr flexiblen Mechanismus zur Kontrolle der Chromatinaktivität. Zum einen ist es entscheidend, welcher Aminosäurerest an welchem Histon wie oft modifiziert wird, wobei Acetylierungen lediglich an bestimmten Lysinresten (K), Phosphorylierungen an Serin- (S) bzw. Threoninresten (T) und Methylierungen an Lysin- (K) bzw. Argininresten (R) erfolgen. Zum zweiten gibt es Mechanismen der Histonmodifikation, bei denen ein Schritt die Aktivität eines vorgeschalteten Enzyms bedarf (Jenuwein und Allis, 2001). Zum dritten kann reguliert werden, ob Histonmodifikationen lediglich lokal ausgebildet werden (z.B. Promoterregion) oder global eingeführt werden (z.B. Domänen oder ganze Chromosomen). Manche Histon-Modifizierungen werden epigenetisch auf die Tochterzellen vererbt, bestimmen deren Expressionsmuster und etablieren somit eine Art Chromatingedächtnis.

Allgemein bewirken Histonacetylierungen (Johnson und Turner, 1999; Roth et al., 2001) und Histonphosphorylierungen (Hsu et al., 2000) eine Ladungsänderung innerhalb des C- bzw. N-Terminus, was zu einer veränderten Interaktionsfähigkeit mit der DNA, mit anderen Proteinen und auch untereinander führen kann. Beide Modifikationen führen infolge der abgeschwächten Bindung zwischen dem flexiblen Histonabschnitt und der DNA zu einem dekondensierten Chromatinzustand und somit gleichzeitig zu einer verbesserten DNA-Zugänglichkeit. Meist spielt die Acetylierung in der lokalen Aktivierung von Promoterregionen eine Rolle. Durch die Auflockerung der chromosomalen Struktur in diesen regulatorischen Sequenzen können Transkriptionsfaktoren, „Remodelling“ Faktoren und andere Komponenten der Transkriptionsmaschinerie binden und somit die Expression von Genen starten.

Histonmodifikationen helfen aber auch direkt bei der Rekrutierung solcher Faktoren. In aktiven Chromatin erfolgt die Rekrutierung bestimmter Faktoren z.B. durch Interaktion der im Protein enthaltenen Bromodomäne mit den acetylierten Lysinresten. Neben

der Aktivierung von Promotoren können Histonacetylierungen auch bei anderen zellulären Prozessen Einfluss nehmen, beispielsweise bei der Replikation oder der DNA-Reparatur. Die Deacetylierung der Histone verhindert eine solche Bindung und stellt dagegen einen kondensierten Zustand des Chromatins her. Deacetylierung befindet sich stets in einem spezifischen Gleichgewicht zur Acetylierung und wirkt inhibitorisch auf die Genexpression. Somit sind Histon-Acetyltransferasen (HAT) Ko-Aktivatoren und Histon-Deacetylasen (HDAC) Ko-Repressoren der Transkription. Es gibt mehrere Familien sowohl von HAT's als auch von HDAC's, welche meist als Untereinheiten in Multiproteinkomplexen wirken (Marmorstein und Roth, 2001; de Ruijter et al., 2003) .

Ähnlich zu den HAT's wirken auch Kinasen über Histonphosphorylierungen genaktivierend. Als Beispiel soll hier die Jil1-Kinase erwähnt werden, welche während der Interphase infolge von H3S10-Phosphorylierung die lokale Chromatin-Struktur durch Dekondensation öffnet (Deng et al., 2008, 2010). Häufig arbeiten HAT's und Kinasen synergistisch zusammen. So fördert die H3S10-Phosphorylierung die Bindung von HAT's und damit die Acetylierung von H3K9 und H3K14. Gleichzeitig wird die H3K9-Methylierung inhibiert und somit auch der deaktivierende Einfluss auf die Genexpression.

Im Gegensatz zur Acetylierung und Phosphorylierung verändern Methylierungen nicht den nukleosomalen Ladungszustand (Kornberg und Lorch, 1999; Strick et al., 2001). Zudem sind solche Modifikationen trotz der Existenz von Demethylasen sehr stabil und bestehen als Modifikation viel länger als Acetylierungen oder Phosphorylierungen. Aus diesem Grund wird der Methylierung eine wichtige Rolle in dem oben genannten vererbaren Chromatingedächtnis zugeschrieben. Wie bei den HAT's gibt es auch von den Histon-Methyltransferasen (HMT) eine Anzahl von Familien, welche an unterschiedlichen Histonen und Aminosäureresten enzymatisch wirken. Im Gegensatz zur Acetylierung und Phosphorylierung können Methylierungen in Abhängigkeit vom modifizierten Histons und dessen Aminosäurereste sowie der Anzahl eingeführter Methylgruppen aktivierend oder inaktivierend auf die Transkription wirken. So wird z.B. trimethyliertes H3K4 sowie H3K36 in aktivem Chromatin und trimethyliertes H3K9 sowie H3K27 in inaktivem Chromatin gefunden. Unterschiedliche Histon-Methylierungen können sowohl an der Rekrutierung spezifischer Faktoren beitragen als auch deren Bindung und Zugänglichkeit blockieren. So kann z.B. der inaktivierende NuRD Komplex nicht an trimethyliertes H3K4 binden (Ahringer, 2000), wohin-

gegen die RNA-Polymerase 2 und der ISWI „Chromatin-Remodeller“ Komplex an diesen Stellen bevorzugt binden und wirken.

Wie bereits erwähnt sind Histonmodifizierungen abhängig voneinander und können sich wechselseitig entweder positiv oder negativ beeinflussen. Dies spielt vor allem dann eine Rolle, wenn das Chromatin dynamisch in seinem Aktivitätszustand verändert werden muss. Zum Beispiel bei der Umwandlung von inaktivem H3K9 trimethylierten Chromatin in aktives H3K14 acetyliertes Chromatin wird zuerst benachbartes H3S10 phosphoryliert. Dies bewirkt, dass das am inaktiven Chromatin gebundene HP1 Protein entfernt wird und damit das trimethylierte H3K9 für die Histon-Demethylase zugänglich wird. Nachdem die drei H3K9 Methylierungen entfernt wurden und H3K14 acetyliert wurde ist die Bindung von HP1 komplett unterdrückt und damit ein stabiler aktiver Chromatin-Zustand erreicht.

Neben den Histonmodifizierungen können auch unterschiedliche Histonvarianten einen Einfluss auf die lokale oder globale Chromatin-Struktur ausüben und damit entweder zelluläre Prozesse wie z.B. Replikation, Transkription oder DNA-Reparation unterstützen bzw. unterdrücken. Mit Ausnahme des Histons 4 wurden für alle anderen Histone in vielen verschiedenen Spezies unterschiedliche Varianten gefunden und biochemisch charakterisiert (Redon et al., 2002; Ahmad und Henikoff, 2002).

### 1.1.3 Höhere Verpackungsgrade

#### 1.1.3.1 Die 30 nm Faser

Die zweite Stufe der DNA-Verpackung beschreibt das Solenoid-Modell, welche die DNA um das ~48fache verdichtet (Abb. 1). Die 30 nm Solenoidfibrille weist eine linksgewundene Superhelixstruktur auf in der eine Helix-Windung aus sechs Nukleosomen gebildet wird (Finch und Klug, 1976). Biochemisch konnte diese Struktur unter Bedingungen hoher Salzkonzentration und bei Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  Ionen reversibel induziert werden und mittels Neutronenstreuungs- und Elektronendichtemessungen verifiziert werden. Es wird vermutet, dass bei dieser Stufe der Verpackung das linker Histon H1 eine wesentliche Rolle einnimmt. Es wird vorgeschlagen, dass das an der DNA gebundene Histon H1 mit anderen H1 Histonen benachbarter Nukleosomen interagiert und somit die 10 nm Nukleosomen-Faser in die 30 nm Solenoid-Faser verpackt. Studien in *Drosophila* und Maus zeigten, dass eine partielle bzw.

vollständige Deletion des linker-Histons H1 in einer Verkürzung des Nukleosomenabstands bzw. einer defekten Chromosomenfaltung resultiert (Fan et al., 2003; Lu et al., 2009). Nach dem heutigen Kenntnisstand wird der Einfluss des H1-Histons auf die chromosomale Verpackung jedoch wieder in Frage gestellt. So konnte gezeigt werden, dass auch ohne H1 eine Ausbildung der 30 nm Solenoidstruktur möglich ist. Dies ist am deutlichsten am Beispiel der Hefe *S. cerevisiae* zu erkennen, welche kein Gen besitzt, dass ein dem H1 Histon ähnliches Protein kodiert, aber dennoch die 30 nm Chromatinstruktur ausbildet (Ohsumi et al., 1993). Stattdessen wird ein wichtiger Einfluss der N- und C-Termini der Histone auf die Bildung der Solenoidstruktur angenommen (Caterino und Hayes, 2011; Öberg und Belikov, 2012; Bharath et al., 2002). Durch Entfernung dieser Termini kann sich die Nukleosomenkette nicht weiter in die Solenoidfaser verpacken. Die C- und N-terminalen Histonenden verfügen über viele basische Aminosäurereste und schirmen demnach die stark negativ geladene DNA an den Kontaktstellen ab. Es wird vorgeschlagen, dass diese Ladungsabschirmung einen stabilisierenden Effekt auf die Chromatinfaltung und somit auf die Solenoidbildung ausübt. Diese Hypothese würde auch den dekondensierenden Effekt von Histonacetylierungen erklären. Die Acetylierung von basischen Aminosäureresten an den terminalen Histonarmen hebt deren positive Ladung auf. Daraus resultiert ein Kontaktverlust zwischen DNA und Histon und somit eine Auflockerung des Chromatins. Aufgrund der begrenzten Auflösung gegenwärtiger Methoden einerseits und der Größe und Komplexität der zu untersuchenden Strukturen andererseits, bleibt diese Form der Verpackung lediglich ein plausibles Modell. Die beschriebenen Ansätze zur Untersuchung höherer Verpackungsstrukturen basieren auf Analysen von Chromatin, welches unter künstlichen Bedingungen (z.B. ist das Ionenmilieu im Zellkern unbekannt) isoliert und behandelt wurde. Diese künstlichen Bedingungen können einen direkten Einfluss auf die native Chromatinstruktur ausüben und damit die Strukturanalysen von Chromatin verfälschen. Alternativ zur Solenoidstruktur wurden bereits andere Modelle der 30 nm Faser beschrieben, welche ebenfalls mit Messdaten belegt und mit dem gegenwärtigen Kenntnisstand plausibel erklärt werden können. Diese alternativen Modelle wie z.B. das „zig-zag“ Modell, das „helical-ribbon“ Modell oder das „crossed-linker“ Modell seien hier nur erwähnt und nicht im Detail beschrieben (Bednar et al., 1995; Dorigo et al., 2004; Schalch et al., 2005). Die uneindeutige Zuordnung der 30 nm Struktur zu einem definierten Verpackungsmodell aufgrund derzeit fehlender hochauflösender Methoden lässt erahnen, dass höhere Verpa-

ckungsgrade noch weitaus schwieriger strukturell aufgeklärt werden können. Unabhängig davon ist eine weitere Kompaktierung notwendig, damit die DNA in den Zellkern passt.

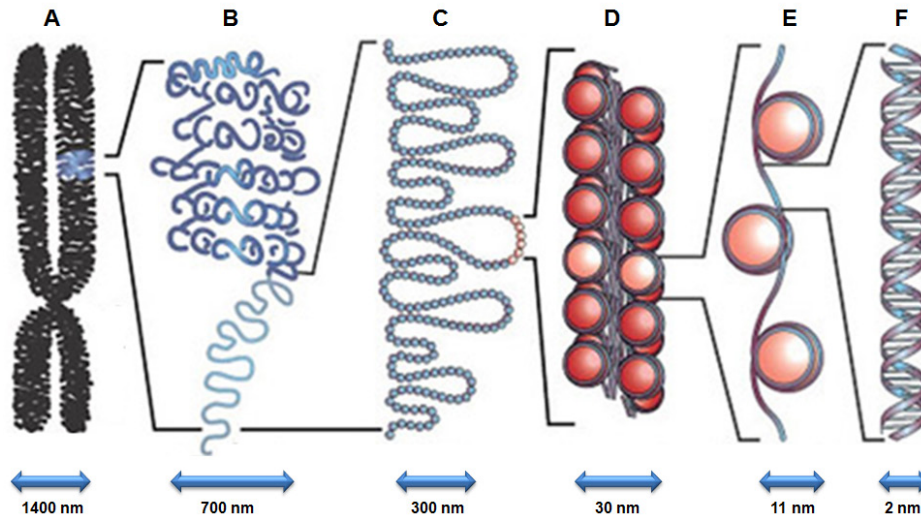


Abb. 1: Die unterschiedlichen Hierarchieformen der DNA Verpackung (Quelle: Felsenfeld and Groudine. Nature, 2003)

- A Chromosom in Metaphase
- B kondensierter Chromosomenabschnitt
- C ausgestreckter schleifenförmiger Chromosomenabschnitt
- D 30 nm Chromosomenfaser aus dichtgepackten Nucleosomen (Solenoid)
- E „Perlenketten“-Form des Chromatins (eine „Perle“ = ein Nucleosom)
- F DNA-Doppelhelix

### 1.1.3.2 Die Schleifendomäne

Jenseits der Verpackungsstufe der 30 nm Faser liegen nur sehr grobe Informationen zur Organisation des Chromatins vor und diese Modellvorstellungen weichen oft stark voneinander ab. Ich möchte daher an dieser Stelle nicht auf alle diese Vorstellungen eingehen, sondern im Weiteren nur noch auf die nächste Verpackung der Schleifendomänen eingehen. Man nimmt an, dass die 30 nm Faser sich schleifenförmig an ein dynamisches Chromatingerüst (nukleare Matrix) oder an die Kernlamina bindet und somit Domänen von einer Größe von ~50-200 kb bildet (Benyajati und Worcel, 1976; Paulsen und Laemmli, 1977; Igo-Kemenes und Zachau, 1978; Jackson et al., 1990; Gerasimova, 2001; Maeshima und Eltsov, 2007; Peric-Hupkes

et al., 2010) (Abb. 1 C). Neuere Methoden die genomweit 3D Interaktionen untersuchen haben solche präferentiellen Kontakte entlang eines Chromosoms nachgewiesen (Sexton et al., 2012; Dixon et al., 2012).

Die Bindung an das Gerüst bzw. an die Matrix erfolgt durch Interaktion mit speziellen Proteinen, wie z.B. Condensin (Gasser et al., 1986; Roberge und Gasser, 1992; Laemmli et al., 1992; Iarovaia et al., 1996; Hudson et al., 2003). Als DNA-Bereich, welcher mit den Gerüst-Proteinen interagiert, wurde eine „matrix association region“ (MAR) (Cockerill und Garrard, 1986) oder „scaffold attachment region“ (SAR) vorgeschlagen (Mirkoverich et al., 1984; Laemmli et al., 1992). Diese Form der Organisation konnte elektronenmikroskopisch bei Metaphase Chromosomen beobachtet werden, nachdem sämtliche Proteine mittels spezifischer Salz- und Detergenzbehandlung entfernt wurden (Marsden et al., 1979; Earnshaw und Laemmli, 1983; Maeshima et al., 2005; Kireev et al., 2008). Ähnliche Schleifenstrukturen konnten auch in Lampenbürstenchromosomen von Amphibien während der meiotischen Prophase identifiziert werden (Morgan et al., 2002). Eine neuere Methode um lokale schleifenbildende Chromatininteraktionen direkt zu identifizieren ist die „chromosome conformation capture“ Analyse (3C) (Gavrilov et al., 2009; Miele et al., 2006; Zhao et al., 2006; Simonis et al., 2006). Mittlerweile werden mittels modifizierten 3C-Methoden (4C oder Hi-C) solche Interaktionen auch genomweit analysiert (Sexton et al., 2009). Sowohl 3C als auch 4C bzw. Hi-C basiert auf intramolekularer Ligation von DNA-Sequenzen, welche in-vivo direkt benachbart sind. Liebermann et al. (2009) hat mittels der Hi-C Methode die Chromatininteraktionen in menschlichen Zellen genomweit analysiert und damit ein spezifisches Verpackungsmodell für das Chromatin propagiert („fractal globule“ Modell).

Man geht davon aus, dass auch das Banden/Interbanden Muster von polytären Chromosomen eine solche schleifenförmige Art der Chromatin-Verpackung reflektiert. Biochemisch wurde die Schleifendomäne als generelle Organisationsstufe bei der Verpackung der DNA vorallem durch die Arbeit von Benyajati und Worcel (1976) vor fast 40 Jahren am Modelltier *Drosophila* nachgewiesen. Später konnten solche Schleifeneinheiten mit ähnlichen Methoden auch bei anderen Organismen (Vertebraten und Invertebraten) nachgewiesen werden (Kemenes und Zachau, 1976).

Auch bei dieser Verpackungsstufe geht man davon aus, dass neben der DNA-Komprimierung auch Aufgaben der Genregulation erfüllt werden (Blanton et al., 2003; Gerasimova et al., 2001; Murrell et al., 2004; Palstra et al., 2003; Sexton et al.,



2009; Tolhuis et al., 2002; Van Bortle and Corces, 2012). Durch die Anordnung des Chromatins in spiralig aufgewundene Schleifen ergeben sich klar abgegrenzte Domänen, welche eine differenzierte Regulation der darin befindlichen Gene ermöglichen (Bell et al., 2001). Auch können durch Schleifenbildung weit entfernte Regionen in unmittelbare Nähe gebracht werden und somit Interaktionen von z.B. Promoter und Enhancer gewährleistet werden bzw. regulative Fragmente in sogenannten „unproduktiven“ Schleifen abgeschirmt und damit blockiert werden (Nolis et al., 2009). Um entwicklungsspezifische bzw. gewebsspezifische Gene innerhalb solcher Domänenstrukturen zu aktivieren bzw. zu inaktivieren oder auch um zellspezifische Prozesse wie Replikation, Transkription oder DNA-Reparation zu gewährleisten muss diese Schleifenstruktur dynamisch sein. Das bedeutet, dass über den Einfluss von epigenetischen Modifikationen und Rekrutierung spezifischer Proteine (z.B. Komponenten der Transkriptionsmaschinerie) solche Domänen entweder kondensiert und inaktiv bzw. dekodensiert und transkriptionell aktiv gehalten werden (Valls et al., 2005; Kouskouti und Talianidis, 2004).

Eine weitere Möglichkeit der transkriptionellen Regulation ist die Interaktion spezifischer Chromatinregionen mit der Kernlamina (Peric-Hupkes et al., 2010). Bei dieser Form der Regulation werden im Verlauf der Zelldifferenzierung chromosomale Abschnitte entweder an die Kernlamina angeheftet bzw. abgelöst. Die innerhalb dieser Abschnitte befindlichen Gene bzw. Gencluster, welche für den entsprechenden Zelltyp unnötig bzw. nötig geworden sind, werden dementsprechend transkriptionell stillgelegt bzw. aktiviert. Die Ablösung dieser chromosomalen Abschnitte erfolgt dabei mit der Bildung von Schleifendomänen.

#### 1.1.3.3 Domänengrenzen

Grundvoraussetzung einer Kontrolle auf Ebene der Schleifendomänen ist die stabile Trennung und Aufrechterhaltung dieser topologisch und funktionell geschlossenen Einheiten, um Einflüsse der benachbarten Domänen und somit Positionseffekte zu verhindern. Dies erfolgt nach gegenwärtigen Vorstellungen durch die sogenannten „boundary-elements“ (Isolatorelemente). Diese Elemente können entweder an den Enden einer linearen Domäne lokalisiert sein oder nach deren Auffaltung in einem Punkt miteinander interagieren und somit gemäß dem Schleifenmodell die dazwischenliegende DNA-Sequenz an der Basis einer Schleife eingrenzen. Unabhängig

davon, ob die Isolatorelemente einzeln oder in Kombination auftreten, sollten sie zwei wichtige Aufgaben erfüllen. Zum einen sollten sie als „barrier-insulator“ wirken. Dabei schützen sie die Domäne und die darin befindlichen Gene gegen die Ausbreitung und den daraus resultierenden Einfluss von benachbartem Heterochromatin (Abb.2A). Zum anderen sollten Isolatorelemente als „enhancer-blocker“ wirken (West et al., 2002), um einen Einfluss benachbarter regulatorischer Elemente auf die innerhalb der Domäne liegenden Gene zu verhindern. „Enhancer-blocker“ sind DNA-Sequenzen, die zwischen einem Enhancer bzw. Silencer und einem Promoter platziert, deren Interaktion verhindern (Abb. 2 B). Experimentell können Isolatorelemente über sogenannte „Enhancer-Blocker assays“ nachgewiesen werden. Dabei wird ein Isolatorelement zwischen ein Reportergen und dem entsprechenden Enhancer positioniert. Dies führt dazu, dass der Promoter des Reportergens von einem Kontakt mit dem Enhancer abgeschirmt wird und er somit die Genexpression nicht antreiben kann. Die Funktion eines „Enhancer-Blockers“ bedarf stets der Bindung spezifischer Proteine, wie z.B. im Fall des Globin-Locus das Protein CTCF (in Maus, Huhn und Mensch). In *Drosophila* existiert ein homologes Protein, das dCTCF. Neben dCTCF gibt es noch eine Reihe anderer Proteine, die als „Enhancer-Blocker“ Faktoren wirken können, wie z.B. Zw(5) oder BEAF32. Die genaue Funktionsweise wie chromosomale Grenzen entweder als „barrier“ oder „Enhancer-Blocker“ wirken können, ist bis heute noch nicht im Detail verstanden. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Mechanismen, wie Enhancer über große Distanzen wirken, noch nicht vollständig entschlüsselt wurden. Verschiedene Modelle beschreiben Enhancer z.B. als Ausgangspunkt einer veränderten Chromatininformation, welche sich entlang der DNA bis zur Promotersequenz fortsetzt und somit die Genexpression antreibt. In diesem Fall bewirkt ein dazwischengeschalteter Isolator, dass der Prozess der fortschreitenden Chromatininformation unterbrochen wird. Ein anderes Modell propagiert die Bildung einer chromosomalen Schleife, welche den Enhancer und den Promoter in räumliche Nähe bringt und somit die Interaktion gewährleistet. Hierbei würde ein zwischengeschalteter Isolator entweder mit dem Enhancer oder dem Promoter „unproduktiv“ interagieren und damit die eigentliche „produktive“ Interaktion zwischen Enhancer und Promoter blockieren (Gaszner und Schedl, 2007).

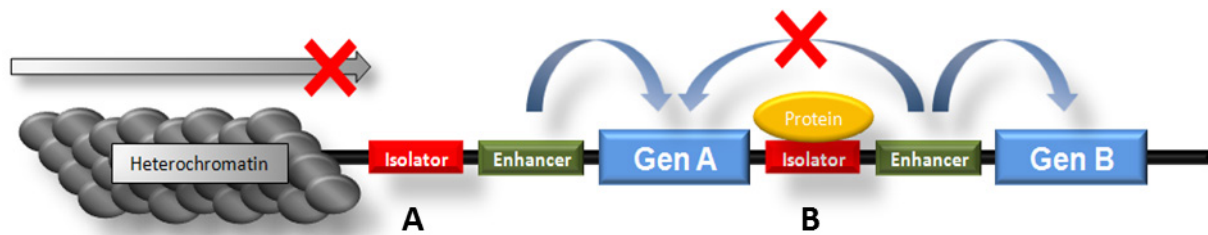


Abb. 2: Funktionsweise von Isolatorelementen. (A) Isolator in Funktion eines „barrier-insulator“ zur Verhinderung der Ausbreitung von Heterochromatin auf benachbarte Bereiche. (B) Isolator in Funktion eines „enhancer-blocker“ zur Verhinderung der Interaktion zwischen Enhancer und Promoter (oft durch Interaktion mit spezifischen Proteinen).

#### 1.1.3.4 Offenes Chromatin

Die in 1.1 erwähnte Unterteilung in offenes, transkriptionell aktives bzw. kompaktes, transkriptionell inaktives Chromatin korreliert mit spezifischen Proteinbindungen und Histonmodifikationen. Dies konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, in denen z.B. über ChIP-Analysen lokal begrenzte oder genomweite Bindungsstudien von Proteinen bzw. Histonmodifikationen durchgeführt wurden welche in Datenbanken abrufbar sind (z.B. modENCODE). Interaktionsstudien belegen, dass Proteine häufig als hochmolekulare Komplexe an bestimmte Chromatinabschnitte lokalisiert sind. Hinsichtlich der Untersuchung der Chromatinstruktur gilt es dabei zu klären, ob diese Komplexe für die Bildung und Aufrechterhaltung von offenem bzw. kompaktem Chromatin verantwortlich sind oder lediglich als Konsequenz der Chromatinverpackung spezifisch binden. Da in meiner Arbeit vor allem die Mechanismen der Bildung von dekondensierten Chromatindomänen am Modell der polytären Chromosomen von *Drosophila* analysiert wurden, werden in diesem Abschnitt die Einflüsse von prominenten Proteinkomplexbindungen innerhalb offenen Chromatins (Interbanden) erläutert, soweit diese für meine Arbeit relevant sind.

Ein wichtiger Proteinkomplex, welcher maßgeblich an der Strukturierung von Interphase-Chromatin beteiligt ist, ist der innerhalb offenen Chromatins lokalisierte Chriz-Komplex. Dieser Komplex besteht aus dem chromodomänen-Protein Chriz (auch „Chromator“ genannt), dem Zink-finger Protein Z4 (auch „putzig“ genannt) und anderen interagierenden Proteinen wie den Insulatorproteinen BEAF32 und CP190 oder der Histon Kinase Jil1 (Gan et al., 2011). Die Interaktion dieser Proteine konnte durch

Co-Immunpräzipitation, Pull-down Analysen und dem „Yeast-Two-Hybrid“ System nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu Chriz und Z4, welche zu 100% innerhalb von Interbanden polytärer Chromosomen sowie in Zellkernen aller bisher getesteten Gewebe kolokalisieren (Gortchakov et al. 2005), ist die Kolokalisierung mit BEAF32, CP190 und Jil1 nicht 100% (Gan et al., 2011). Dies hängt damit zusammen, dass diese drei Proteine entweder mehr dynamisch an den Chriz/Z4-Komplex binden oder unabhängig von Chriz auch in anderen Proteinkomplexen vorkommen (z.B. Jil1 bei der Dosiskompensation) (Mohan et al., 2007; Kind et al., 2008; Bartkuhn et al., 2009; Bushey et al., 2009; Raja et al., 2010). Sowohl Chriz als auch Z4 sind ubiquitär exprimiert und spielen eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Struktur von Interphasechromosomen. Der essentielle Charakter von Chriz und Z4 für die Struktur von Chromatin konnte durch zytogenetische Analysen von hypomorphen Mutanten sowie RNAi „knock-down“ Mutanten nachgewiesen werden. Sowohl bei hypomorphen Mutanten als auch bei RNAi Mutanten für Chriz bzw. Z4 ist die Struktur polytärer Interphasechromosomen gestört, was sich in einem Verlust des typischen Banden/Interbandenmusters widerspiegelt (Eggert et al., 2004; Gortchakov et al., 2005; Rath et al., 2006). Eine mögliche Rolle für Chriz bzw. Z4 in der Strukturierung von Chromosomen könnte in einer korrekten parallelen Anordnung der Chromosomenfasern in polytären Chromosomen liegen. Alternativ könnte Chriz bzw. Z4 an der Etablierung chromosomaler Domänen-Grenzen unterschiedlich kompaktierten Chromatins mitwirken. Diese Möglichkeit wird unterstützt durch die Identifikation spezifischer „boundary“ Element Faktoren (BEAF und CP190), welche in ihrer Bindung mit Chriz und Z4 signifikant überlappen (Gan et al., 2011). Eine weitere Rolle von Chriz und Z4 könnte in der Rekrutierung der Histon-Kinase Jil1 liegen. Studien von Rath et al. (2006) lassen auf eine direkte Interaktion beider Proteine schließen, welche über den C-Terminus vermittelt wird. Die Jil1-Kinase bewirkt über die Phosphorylierung an H3K9 eine lokale Dekondensation des Chromatins sowie eine Blockierung der Ausbreitung heterochromatischer Histonmodifikationen (z.B. H3K27Me3) und trägt somit an der Strukturierung von Interphasechromatin bei (Deng et al., 2008). In Jil1-Mutanten ist die Struktur polytärer Chromosomen massiv gestört, was sich in einer willkürlichen Vermischung kompakten und offenen Chromatins sowie einer erhöhten Ausbreitung heterochromatischer Faktoren wie H3K9Me2 und HP1 widerspiegelt (Zhang et al., 2006). Bei einem Chriz RNAi „knock-down“ ist auch die Jil1 Aktivität

beeinflusst. Dies resultiert in einer drastisch reduzierten H3S10 Phosphorylierung und damit ähnlich wie bei Jil1-Mutanten, in einer gestörten Chromosomenstruktur. Dies verdeutlicht, dass Chriz essentiell für die Lokalisierung der Jil1 Aktivität ist und damit für die korrekte Ausbildung von offenem Chromatin benötigt wird (Rath et al., 2006).

Bis heute ist nicht geklärt, wie Chriz und Z4 an die DNA binden. Im Gegensatz zu anderen Chromodomänen Proteinen (z.B. HP1 und PC) bindet Chriz nicht an di- und trimethylierten H3K9 bzw. H3K27. So kann Chriz weder im Chromozentrum noch in perizentrischen Chromatin nachgewiesen werden, welche stark angereichert sind mit diesen Histonmodifikationen (Ebert et al., 2004).

Eine attraktive Erklärung für die Chromatin-Bindung von Chriz und Z4 ist die Rekrutierung dieser Proteine über DNA-bindende Proteine. So konnten Vogelmann et al. (2014) sowohl in vivo als auch in vitro eine Interaktion zwischen BEAF32 und der C-terminalen Domäne von Chriz nachweisen. Die Autoren schlagen ein Modell vor, in dem in einem ersten Schritt DNA-bindende Proteine wie BEAF32, dCTCF oder Su(Hw) an ihre jeweiligen DNA-Konsensus-Sequenzen binden (z.B. CGATA für BEAF32) und diese in einem zweiten Schritt eine Plattform für die Rekrutierung von Kofaktor-Proteinen wie Chriz oder CP190 bilden. Im Fall von Chriz kann in einem dritten Schritt die Histon-Kinase Jil1 innerhalb aktiven Chromatins (Interbanden) rekrutiert werden, welche über H3S10 Phosphorylierung lokal zur Etablierung dekon-densierten Chromatins beiträgt. Als alternativen Mechanismus beschreibt Vogelmann et al. (2014), dass die am Insulatorprotein BEAF32 gebundenen Proteine CP190 bzw. Chriz über ihren N-Terminus unter Bildung von Homodimeren Interaktionen zu weit entfernten DNA-bindenden Insulatorproteinen (BEAF32, dCTCF und Su(Hw)) aufbauen. Dies erfolgt unter Ausbildung chromosomaler Schleifen. Über diese sogenannten „long-range“ Interaktionen kann Chriz bzw. CP190 zur Insulatoraktivität an Domänengrenzen beitragen und somit unterschiedlich kompaktiertes Chromatin stabil aufrechterhalten.

Neuere Studien belegen eine genetische Interaktion des NURF-Komplex mit dem Protein Z4 (Kugler et al., 2011) und eröffnen somit die Frage, ob zwischen dem Chriz- und dem NURF-Komplex ein funktionelles Zusammenspiel existiert.

Der NURF-Komplex (Nucleosome Remodeling Factor) ist ein weiterer Proteinfaktor, der maßgeblich an der Strukturierung von Chromatin beteiligt ist. NURF gehört zur Gruppe der Nucleosomen-Remodeller, welcher über vier Untereinheiten verfügt. Eine

dieser Untereinheiten repräsentiert die ISWI ATPase, mit deren Hilfe der NURF-Komplex ATP abhängig lokal Nukleosomen ablösen bzw. verschieben kann und somit offenes Chromatin etabliert (Suehyb et al., 2011). Der NURF-Komplex mobilisiert bidirektional Nukleosomen in 10bp Schritten über lokale Ablösung der DNA von der Nukleosomenoberfläche (Hamiche et al., 1999; Schwanbeck et al., 2004) und gewährleistet somit eine Verschiebung des Nukleosoms entlang der DNA in eine andere thermodynamisch stabile Position. Auch DNA bindende Faktoren bzw. benachbarte Nukleosomen können eine wichtige Rolle in der NURF-abhängigen Nukleosomen Remodellierung spielen, indem sie z.B. als Barrieren der Nukleosomenverschiebungen fungieren (Kang et al., 2002).

Die Arbeit von Bohla et al. (2014) legt nahe, dass CP190 an das DNA-bindende Insulatorprotein CTCF bindet und damit eine Plattform für die Rekrutierung des NURF-Komplexes bildet. Diese Rekrutierung bewirkt eine lokale Modifikation der Chromatinstruktur in Form einer verringerten Nukleosomendichte an Insulatorstellen. Funktionell trägt dies zu einer effizienteren Enhancer-Blocker Aktivität der gebundenen Insulatorproteine (CTCF und CP190) bei und zu einer verbesserten Vermittlung transkriptioneller Regulation an TSS über die erleichterte Rekrutierung von Faktoren der Transkriptionsmaschinerie. Auch bei der Dosiskompensation bei *Drosophila* spielt NURF eine essentielle Rolle als Regulator der Chromatinstruktur. Mutationen spezifischer NURF-Komponenten resultieren in einer dramatischen Dekondensierung des männlichen X-Chromosoms und damit in einer erhöhten Expression bestimmter X-chromosomaler Gene (Bhadra et al., 2005; Bai et al., 2007).

Als dritten und letzten Proteinkomplex möchte ich den NSL-Komplex (nonspecific lethal) erläutern. Der NSL-Komplex wirkt im Genom von Säugern und *Drosophila* an zahlreichen Promoterregionen als Regulator der Transkription von Zielgenen, welche überwiegend Haushaltsgene repräsentieren (Feller et al., 2011). Frühere Studien belegen, dass die H4K16 Histonacetyltransferase MOF (male absent on first) mit dem NSL-Komplex assoziiert und zusammen kooperativ die Transkription reguliert. Dies konnte sowohl zytogenetisch über Immunfärbung als auch molekular über ChIP Analysen nachgewiesen werden (Raja et al., 2010). Der transkriptionelle Einfluss auf die Promoterregion könnte darin liegen, dass MOF die Chromatinstruktur über die Etablierung von acetylierten H4K16 offen hält und somit die Rekrutierung von Komponenten der Transkriptionsmaschinerie erleichtert.

Mit Hilfe von NSL- bzw. MOF-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Promoterbindung von MOF vom NSL-Komplex abhängig ist und nicht umgekehrt. Weiterhin wurde bei NSL-Mutanten eine beeinträchtigte Rekrutierung der RNA Polymerase 2 festgestellt, was darauf hindeutet, dass der NSL-Komplex bei frühen Schritten der Transkriptionsinitiierung beteiligt ist (Raja et al., 2010). Offen bleibt die Frage, wie der NSL-Komplex an die Promoterregionen der Zielgene bindet. Möglich wäre, dass der NSL-Komplex über Bindung an spezifische DNA Konsensussequenzen, über Interaktion mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie bzw. regulatorischen Proteinen oder über Erkennung spezifischer Histonmodifikationen an die entsprechende Promoterregion bindet.

Interessanterweise konnte auch eine signifikante Kolo-kalisierung des NSL-Komplex mit dem NURF Komplex festgestellt werden (Feller et al., 2011). Eine solche Interaktion konnte für die homologen Proteine in *Xenopus* auch genetisch nachgewiesen werden (Wysocka et al., 2006). Die Rekrutierung von NURF an NSL-spezifischen Promoterregionen könnte über die von MOF etablierten H4K16ac Modifikationen erfolgen. In Säugern konnte diese spezifische Erkennung und Bindung des NURF-Homologs an acetyliertes H4K16 nachgewiesen werden (Ruthenburg et al., 2011). Der NURF-Komplex, welcher an die Promoterregion von NSL-Zielgenen rekrutiert wird, könnte über den Mechanismus der Nukleosomenremodellierung an der Regulation der Transkription dieser Gene involviert sein.

Die oben beschriebenen Proteinkomplexe, welche spezifisch an Chromatin binden und Einfluss auf dessen Struktur ausüben repräsentieren lediglich eine kleine Auswahl an Kandidaten. Die angeschnittenen komplexen Mechanismen mit denen diese Proteinkomplexe spezifisch wirken und interagieren verdeutlichen, dass für ein umfassenderes Verständnis der Chromatinstrukturierung weitere Analysen notwendig sind.

## 1.2 Polytäne Chromosomen

Der in dieser Arbeit genutzte Modellorganismus *D. melanogaster* gehört zur Gruppe der Diptera (Zweiflügler) und stellt ein holometabolisches Insekt dar, dass die Entwicklungsstadien des Embryo, der Larve (3 Stadien), der Puppe bis zum adulten fertilen Insekt durchläuft. Die larvalen Stadien verlaufen über vier Tage und sind durch zwei Häutungen getrennte Wachstumsstadien, in dem die Tiere an Größe und Ge-

wicht zunehmen. Dieses Wachstum wird in vielen larvalen Geweben durch eine Zunahme der Zellmasse bzw. des Zellvolumens erreicht und nicht durch Zunahme der Zellzahl. Im Zusammenhang mit dem Zellwachstum steht eine Größenzunahme der Zellkerne, da sich die Chromosomen infolge eines abgewandelten Zellzyklus (Endoreplikation) mehrfach replizieren ohne eine Kernteilung (Mitose) zu durchlaufen. Die Abwandlung besteht darin, dass die Zelle lediglich eine S- und G-Phase durchläuft und sich damit in Abwesenheit einer mitotischen Phase permanent in der Interphase befindet (Smith und Orr-Weaver, 1991; Zhimulev, 1999). Dieser Prozess der Endoreplikation wird während der mittleren Embryogenese gestartet (Smith und Orr-Weaver; 1991). Eine weitere Besonderheit der vervielfachten Chromatiden bildet ihre Chromatidenpaarung, wobei die amplifizierte Schwesterchromatiden der homologen Chromosomen Seite an Seite in einem Chromosom vereinigt werden. Die auf diese Weise gebildeten polyploiden Interphase-Chromosomen werden auch Riesenchromosomen bzw. polytäre Chromosomen genannt. Polytäre Zellen treten in diversen Gewebetypen (z.B. Fettkörperzellen, Keimbahnzellen, abdominale Histoblasten, Malpighische Gefäße) unterschiedlicher Organismen (z.B. Insekten, Infusorien, Säugern, Pflanzen) auf (Zhimulev, 1996). Diese Zellen spielen immer dann eine bedeutende Rolle, wenn in speziellen Geweben oder in bestimmten Entwicklungsstufen eine hohe Aktivität eines bestimmten Organs (meist sekretorischer Funktion) benötigt wird.

Wie aus dem Namen schon ersichtlich sind polytäre Riesenchromosomen viel größer als normal und bereits unter dem Lichtmikroskop gut zu analysieren. Im dritten Larvenstadium von *D. melanogaster* bestehen die polytären Chromosomen von Speicheldrüsen aus ungefähr 1000 parallel zu Bündeln angeordneten Schwesterchromatiden und können somit eine Dicke von 2,8 – 4 µm erreichen. Der Polytänisierungsgrad kann in Abhängigkeit von dem jeweiligen Gewebe bzw. Entwicklungsstadium und unterschiedlichen Zellen eines Organs (z.B. Speicheldrüse) variieren (Rasch et al., 1970; Zhimulev und Koryakov. 2009). Durch die exakt parallele Ausrichtung der einzelnen homologen Chromatiden während der Polytänisierung entsteht ein charakteristisches Muster aus dichter gepackten Banden ( $\geq 30$  nm) und weniger kondensierten Interbanden (10 nm) (Beermann 1972; Rykowski et al., 1988) (Abb. 3). Aufgrund dieses unterschiedlichen Kondensierungsgrades erscheinen im Phasenkontrast die Banden dunkel und die Interbanden hell. Das charakteristische Muster aus Banden und Interbanden ist innerhalb einer Spezies konserviert und hat



schon frühzeitig die Erstellung von Chromosomenkarten ermöglicht (Bridges, 1935,1938; Sorsa und Sorsa, 1967; Sorsa, 1988; Ashburner, 1998). Infolge des hohen Konservierungsgrades dieses Banden/Interbanden-Musters kann man mit Hilfe vergleichender Analysen unterschiedlicher Spezies sogar Aussagen zu deren evolutionärer Verwandtschaft treffen. Der Grad der Übereinstimmung ist dabei ein Indikator für die evolutionäre „Entfernung“ (Schaeffer et al., 2008).

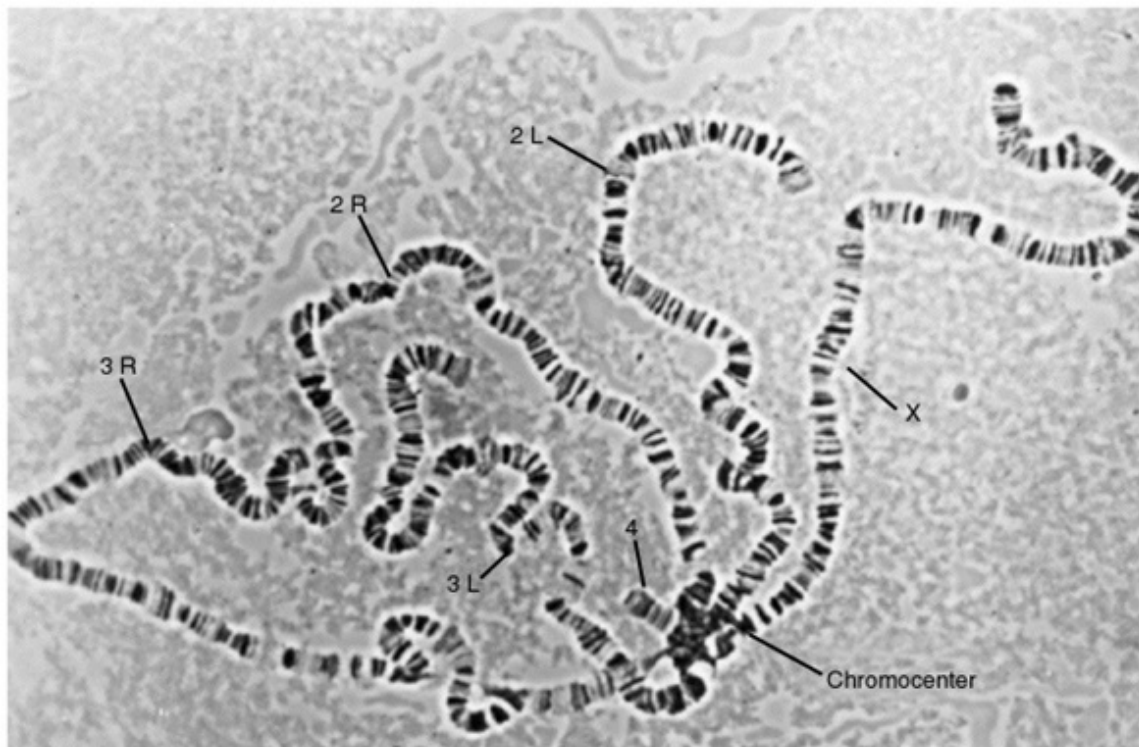


Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahme der polytären Chromosomenarme (2L, 2R, 3L, 3R, 4, X) ausgehend vom heterochromatischen Chromocenter bei *D. melanogaster*. (Quelle: *Principles of Genetics* (Biol2250))

Veränderungen dieses Musters sind vor allem bedingt durch entwicklungsabhängige Veränderungen der Genexpression. Wird ein Gen innerhalb einer Bandenregion gewebsspezifisch bzw. zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung aktiviert, verändert sich die chromosomale Struktur und es kommt zu einer lokalen Aufspiralisierung der DNA. Die dabei entstehende Chromatinstruktur wird aufgrund ihrer diffusen und aufgeblähten Erscheinung als „Puff“ bezeichnet (Ashburner, 1967). Besonders stark transkribierte Regionen bilden lokal extrem aufgelockerte und demzufolge sehr große „Puff“-Strukturen, welche ausgehend vom Locus erhöhter Transkription auch

die strukturelle Integrität angrenzender Domänen beeinflussen. Diese Strukturen werden gemäß ihrem Entdecker Balbiani-Ringe (Beermann, 1971) genannt. Balbiani Ringe bei *Chironomus* treten lediglich in Zellen von Speicheldrüsen auf (Beermann, 1952, 1962, 1963). Durch Licht- und Elektronenmikroskopische Strukturanalysen wurde entdeckt, dass sich die DNA innerhalb eines „Puffs“ zu individuellen Filamenten auflockert und dabei Schleifenstrukturen bildet. „Puff“ Strukturen bis hin zu ihrer extremen Erscheinung als Balbiani Ringe können auch artifiziell erzeugt werden, indem die transkriptionelle Aktivität eines Gens induziert wird. Diese Induktion kann z.B. endogen mittels Röntgenstrahlung und Hitzeschock oder bei bestimmten Transgenen mittels des UAS/GAL4-Systems erfolgen.

Die polytären Chromosomen in den Speicheldrüsen von *Drosophila* bestehen aus 5 langen Armen (telozentrisches Gonosom X und den Armen der metazentrischen Autosomen 2L,2R,3L und 3R) und einem kurzen Arm (telozentrisches Chromosom 4). Alle Arme vereinigen sich mit ihrem Zentromerbereich in einem heterochromatischen Chromozentrum, in das beim Männchen auch das heterochromatische Y-Chromosom eingeschlossen wird. Derzeit sind etwa 5000 Banden bzw. Interbanden bekannt (Saura et al., 1996), welche mit Hilfe hochauflösender Elektronenmikroskopie kartiert wurden. Seitdem entdeckt wurde, dass die Anzahl der Gene (~13600 Gene) weit höher ist als die Zahl der Banden bzw. Interbanden ist man von der Vorstellung abgekommen, dass jede Banden/Interbanden-Einheit nur ein Gen verkörpert (Judd, 1998, Hall et al., 1983; Adams et al., 2000). Desweiteren ergab eine vergleichende Analyse einer ~2,6 Mb großen kartierten Region des X-Chromosoms keine eindeutige Korrelation zwischen der Anzahl der darin befindlichen Gene und der Anzahl der Banden bzw. Interbandendomänen (Benos et al., 2001). Manche Autoren vermuten daher, dass es weit mehr Banden und Interbanden gibt als bisher nachgewiesen sind und diese nur infolge der begrenzten mikroskopischen Auflösung nicht identifiziert werden konnten (Rykowski et al., 1988). Auch bei der Bestimmung des DNA-Gehalts von Banden und Interbanden gibt es Unterschiede. Banden haben nach cytophotometrischen Messungen einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 5 -100 kb und machen ungefähr 95% der genomischen DNA aus. Die übrigen 5% werden von den Interbanden eingenommen, welche durchschnittlich 0,3 – 0,4 kb DNA enthalten sollen (Rykowski, 1988; Demakov et al., 2004; Beermann 1972; Sorsa 1984; Zhimulev 1996). Laird hingegen nutzte die Bestimmung der Trockenmasse von Banden und Interbanden im Elektronenmikroskop und kommt zu der Abschätzung, dass die DNA in den

Banden 75% und in Interbanden 25% des Interphasechromatins ausmachen (Laird, 1980).

Die genaue Bedeutung der Banden bzw. Interbanden hinsichtlich ihrer transkriptionellen Eigenschaften und der Bildung funktioneller Einheiten ist ebenfalls noch nicht genau bekannt (Demakov et al., 1993). Man geht davon aus, dass Banden im Gegensatz zu Interbanden und Puffs transkriptionell wenig aktiv sind. Diese Annahme wird unterstützt durch Identifizierung von Topoisomerasen (Fleischmann et al., 1984), RNA-Polymerase II (Jamrich et al., 1977), <sup>3</sup>H-Uridin, genregulatorischer Sequenzen (Semeshin et al., 1979) und diverser Transkriptionsfaktoren (Kaplan et al., 2000; Lis et al., 2000), die spezifisch in Interbanden lokalisiert sind.

Das Banden/Interbanden-Muster lässt auf das Vorhandensein von boundary Elementen schließen, die diese zwei Domänen klar und stabil voneinander trennen. Die molekulare Beschaffenheit dieser boundary Elemente und ihre funktionelle Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierter Chromatinstrukturen (Interbanden) ist bis heute noch nicht im Detail verstanden. Diesbezüglich fehlt es derzeit an geeigneten Methoden die genauen Grenzregionen zwischen Banden und Interbanden zu kartieren. Lediglich zwei polytäne Bandendomänen (10A1-2 und 75C1-2) und eine Interbandendomäne (3C6-7) wurden auf eine Genauigkeit von ~5 kb relativ präzise kartiert.

### 1.3 Funktionelle Organisation in polytänen und diploiden Chromosomen

Polytäne Chromosomen stellen im Vergleich zu Interphasechromosomen diploider Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Stabilität eine Besonderheit dar und bieten daher seit langem ein hervorragendes Modellsystem für molekulargenetische und zytologische Untersuchungen.

Trotz einer Vielzahl an detaillierten Studien mit polytänen Chromosomen bleibt eine große Wissenslücke, was die funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit der Chromatinorganisation in polytänen und diploiden Zellen anbetrifft. Lange Zeit blieb völlig offen, ob diploide Interphasechromosomen analoge Strukturen zu dem Banden/Interbandenmuster der polytänen Chromosomen bilden. Kürzliche Studien unter Verwendung genomweiter Bindungsprofile charakteristischer molekularer Marker in diploiden Zellen lassen vermuten, dass die funktionelle Organisation von polytänen und diploiden Zellen identisch ist (Vatolina et al., 2011).

Wie in 1.1.3 bereits erwähnt ist das Interphasechromatin sowohl in diploiden Zellen als auch in polytären Zellen in topologisch und funktionell geschlossene Schleifendomänen organisiert. Somit stellt die Schleifenbildung ein generelles Motif der Chromatinorganisation dar, auch wenn die Chromatindomänen einer lokalen Dynamik von zell- oder entwicklungsspezifischer Genexpression unterliegen (Blanton et al., 2003, Murrell et al., 2004, Palstra et al., 2003; Peric-Hupkes et al., 2010; Sexton et al. 2009; Tolhuis et al., 2002). Diese einheitliche Organisation von Chromatindomänen wurde mittlerweile durch neuere Studien auch auf molekularer Ebene ergänzt (Vatolina et al., 2011; Demakov et al., 2011; Zhimulev et al., 2014). Genomweite Studien über Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) umfassen die Lokalisierung epigenetischer Marker wie z.B. Proteinbindungen und Histonmodifikationen und sind in Datenbanken verfügbar (z.B. modENCODE). Diese Marker definieren den lokalen epigenetischen Zustand des Chromatins und spiegeln somit den Grad der Kondensierung, sowohl in polytären als auch in diploiden Interphasechromosomen wieder. Aus diesem Grund ist eine Analyse der molekularen Bindungsprofile epigenetischer Marker von besonderer Bedeutung und ermöglicht Vergleiche der Struktur chromosomaler Domänen in verschiedenen Zelltypen.

Im Falle der offenen Interbanden-Chromatinstruktur konnte die Rekrutierung von Nukleosom-„Remodeller“ Proteinen wie Brahma, TRX (Demakov et al., 2011) und der H3S10-Kinase Jil-1 (Wang et al., 2001), Isolator Proteinen wie BEAF32AB, CP190 und dCTCF (Van Bortle und Corces, 2012) und interbandenspezifischen Proteinen unbekannter Funktion wie Chriz (Gortchakov et al., 2005; Rath et al., 2006) und Z4 (Eggert et al., 2004) bereits immunzytologisch nachgewiesen werden und lässt eine mögliche Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierten Chromatins vermuten. Neben der Bindung typischer Proteinkandidaten ist das Interbandenchromatin auch für spezifische Histonmodifikationen wie zum Beispiel H4K16Ac, H3K9Ac, H3K4Me3 und H3S10Ph (Vatolina et al., 2011; Demakov et al., 2011) angereichert, welche ebenfalls essentiell für die Ausbildung von dekondensiertem Chromatin sein könnten. Ein Vergleich dieser Marker in polytären Interphasechromosomen mit den aus genomweiten Datenbanken gewonnenen Bindungsprofilen (z.B. modENCODE) für diploide Zellen kann Korrelationen zwischen Chromatinabschnitten unterschiedlicher Kondensation aufdecken. Für eine genaue Bestimmung der Domängengrenzen innerhalb des Banden/Interbanden Musters und damit für eine präzise Aussage über den Grad der Konserviertheit in verschiedenen Zelltypen sind immun-

zytologische Methoden in ihrer Auflösung nicht ausreichend (Vatolina et al., 2011). Hierzu bedarf es moderner hochauflösender Techniken wie z.B. der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit deren Hilfe spezifische Proteine oder Histonmodifikationen entweder genomweit oder lokal in polytären als auch nicht-polytären Geweben präzise kartiert werden können. Die daraus gewonnen Bindungsprofile geben in Verbindung mit zytogetischen Kartierungsmethoden (z.B. FISH) und bereits gewonnen Erkenntnissen über Interbandenspezifische Proteine, Isolatorproteine und Histonmodifikationen Aufschluss über die Position der Domänengrenzen und den Grad der Konservierung der chromosomalen Organisation in verschiedenen Zelltypen. Neben diesen Korrelationen zwischen molekularer Zusammensetzung und Struktur werden aber künftig vermehrt experimentelle Ansätze notwendig sein um den Zusammenhang zwischen chromosomaler Struktur und Funktion zu testen.

#### 1.4 $\Phi$ C31 Sequenz-spezifische Rekombination

Für die Erforschung der Vorgänge bei Bildung und Aufrechterhaltung chromosomaler Domänen sind Methoden notwendig, die eine lokale Veränderung des Chromatins ermöglichen. Eine Möglichkeit zur Generierung dieser Veränderung ist die Sequenz-spezifische Rekombination, mit deren Hilfe die zu untersuchenden Sequenzen gezielt in das eukaryotische Genom integriert werden können. Eine Methode dieser Sequenz-spezifischen Rekombination ist das *Streptomyces*-Phagen-System ( $\Phi$ C31) (Thorpe und Smith, 1998). Dieses System verwendet eine Sequenz-spezifische Serin-Rekombinase, die  $\Phi$ C31-Integrase. Dieses Enzym gehört zur Familie der Resolvasen/Invertasen und verfügt über eine konservierte N-terminale katalytische Domäne (Grindley, 2002; Johnson, 2002). Die Sequenz-spezifische Rekombination erfolgt durch Bindung der Integrase an ihre jeweiligen Erkennungssequenzen (targets). Im Fall der  $\Phi$ C31-Rekombination sind dies die sogenannten attachment-Stellen (att-Sequenzen), bestehend aus der attB-Sequenz (bacterial, 34 bp) und der attP-Sequenz (phage, 39 bp) (Kuhstoss und Rao, 1991; Groth et al., 2000; Combes et al., 2002). Der *Streptomyces*-Phage hat sich diesen rekombinativen Mechanismus zu Nutze gemacht, indem er über die integrative Rekombination ins bakterielle Wirtsgenom (*Streptomyces coelicolor*) integriert und danach lysogen vermehrt und verbreitet wird (Smith et al., 2004). Bei der Integration erfolgt ein durch die Integrase katalysierter reziproker Strang austausch zwischen der Phagen-kodierten attP-Sequenz und

der bakteriellen attB-Wirtssequenz unter Bildung der Rekombinationsprodukte attL und attR (Thorpe et al., 2000). Die Substrate (attP und attB) werden bei diesem Vorgang räumlich zusammengebracht und bilden eine Synapsenstruktur (Abb. 4 A). Anschließend werden alle vier DNA-Stränge jeweils an der 2 bp großen Crossover-Sequenz synchron geschnitten und reziprok ausgetauscht. Beim Strangaustausch bildet die Hydroxylgruppe eines konservierten Serin-Restes (S10) der Integrase zusammen mit dem geschnittenen 5'Phosphat-DNA Ende an der Crossover-Seite eine transiente Phosphoserine-Bindung, welche der Serin-Rekombinase ihren Namen gibt (Ghosh et al., 2003; Smith et al., 2004). Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand erfolgt der eigentliche Strangaustausch durch eine 180° Rotation von zwei der insgesamt vier Integrase-Untereinheiten, welche kovalent mit den geschnittenen DNA-Strängen verbunden sind (Abb. 4 B). Anschließend werden die komplementären DNA-Sequenzen an der Crossover-Seite miteinander verknüpft (Stark et al., 1992; Nöllmann et al., 2004; Li et al., 2005; Kamtekar et al., 2006). Aufgrund eines asymmetrischen Schnitts innerhalb der Crossover-Stelle erfolgt die Neuverknüpfung der att-Sequenzen nach folgendem Muster: Der linke Arm einer att-Sequenz verbindet sich immer mit dem rechten Arm seiner Partner-Sequenz unter Bildung der Hybridsequenzen attL und attR ( $\text{attL} = \text{attB}_{\text{links}} / \text{attP}_{\text{rechts}}$  bzw.  $\text{attR} = \text{attP}_{\text{links}} / \text{attB}_{\text{rechts}}$ ) (Abb. 4 C). Beim Übergang vom lysogenen zum lytischen Zyklus wird das Phagengenom über exzisive Rekombination aus dem Wirtsgenom herausgeschnitten und vermehrt sich in diesem Zustand aktiv extrachromosomal. Hierfür ist neben der Integrase auch das Hilfsprotein Xis notwendig, welches in vitro nicht vorliegt (Azaro et al., 2002; Ghosh et al., 2006). Deshalb kann in in vitro Experimenten die Integrase nur die Rekombination zwischen attP und attB katalysieren und ist bei allen anderen att-Kombinationen inert (z.B. attB-attB; attP-attP; attL-attR). Aus diesem Grund stellt die  $\Phi$ C31 katalysierte Rekombination einen unidirektionalen Vorgang dar (Thorpe und Smith, 1998; Thorpe et al., 2000; Gupta et al., 2007), der zum Zwecke der stabilen Integration von DNA-Sequenzen breite Anwendung in der experimentellen Forschung findet (Olivares et al., 2001,2002; Andreas et al., 2002; Ortiz-Urda et al., 2002; Stoll et al. 2002; Belteki et al., 2003). Eine Variante der rekombinativen Integration von DNA-Sequenzen stellt der „Rekombinase vermittelte Kassetten Austausch“ (Recombinase mediated cassette exchange = RMCE) dar (Bateman et al., 2006). Der Vorteil gegenüber der „einfachen“  $\Phi$ C31-Integration, welche lediglich die Rekombination zwischen einer att-P Zielstelle und einem attB-tragenden Plasmid katalysiert,

lysiert ist, dass ausschließlich die Sequenz von Interesse integriert wird und keine zusätzlichen Sequenzen wie z.B. die Vektor-DNA.

Der Vorteil der  $\Phi$ C31-Rekombination gegenüber der P-Element vermittelten Keimbahntransformation besteht darin, dass die transgene Sequenz zielgerichtet und mit hoher Effizienz in einen definierten Locus inseriert werden kann. Eine Landestelle für zielgerichtete Insertion in dieselbe chromosomale Position kann über die Verwendung attP tragender P-Elemente ins Genom eingebaut werden. Alternativ sind bereits verschiedene *Drosophila* Stämme verfügbar, die an definierten Stellen im Genom solche attP Stellen bereits integriert haben. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit Varianten ein und derselben Sequenz in denselben Ort zu integrieren und zu untersuchen, wobei variable Einflüsse von Positionseffekten verhindert werden. Insbesondere bei Vergleichsstudien der Expression unterschiedlicher Gene ist ein Ausschluss von Positionseffekten notwendig (Gortchakov et al., 2003; Levis et al., 1985).

Neben der Anwendung in *Drosophila* Embryonen findet das  $\Phi$ C31-System auch Einsatz in anderen Zellen bzw. Modellorganismen wie z.B. Säugerzellen, Embryonen von *Xenopus laevis* und dem Moskito *Aedes aegypti* (Fish et al., 2007; Groth et al., 2000; Thyagarajan et al., 2001; Olivares et al., 2002; Ortiz-Urda et al., 2002,2003). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass im Genom von Maus, Mensch und *Drosophila* sogenannte „Pseudo attP“ Kassetten auftreten, welche von der Integrase erkannt werden und folglich eine Rekombination stattfinden kann. Diese „Pseudo-attP“ Stellen weisen eine 30-45% identische DNA-Sequenz zu den „normalen“ attP-Stellen auf und stehen, wenn auch nur geringfügig, in Konkurrenz zu den transgen eingefügten attP-Landeseiten (Thyagarajan et al., 2001; Olivares et al., 2002; Groth et al., 2004). Solche „Pseudo“ attP Stellen sind jedoch nur bei größeren Genomen ein ernsthaftes Problem.

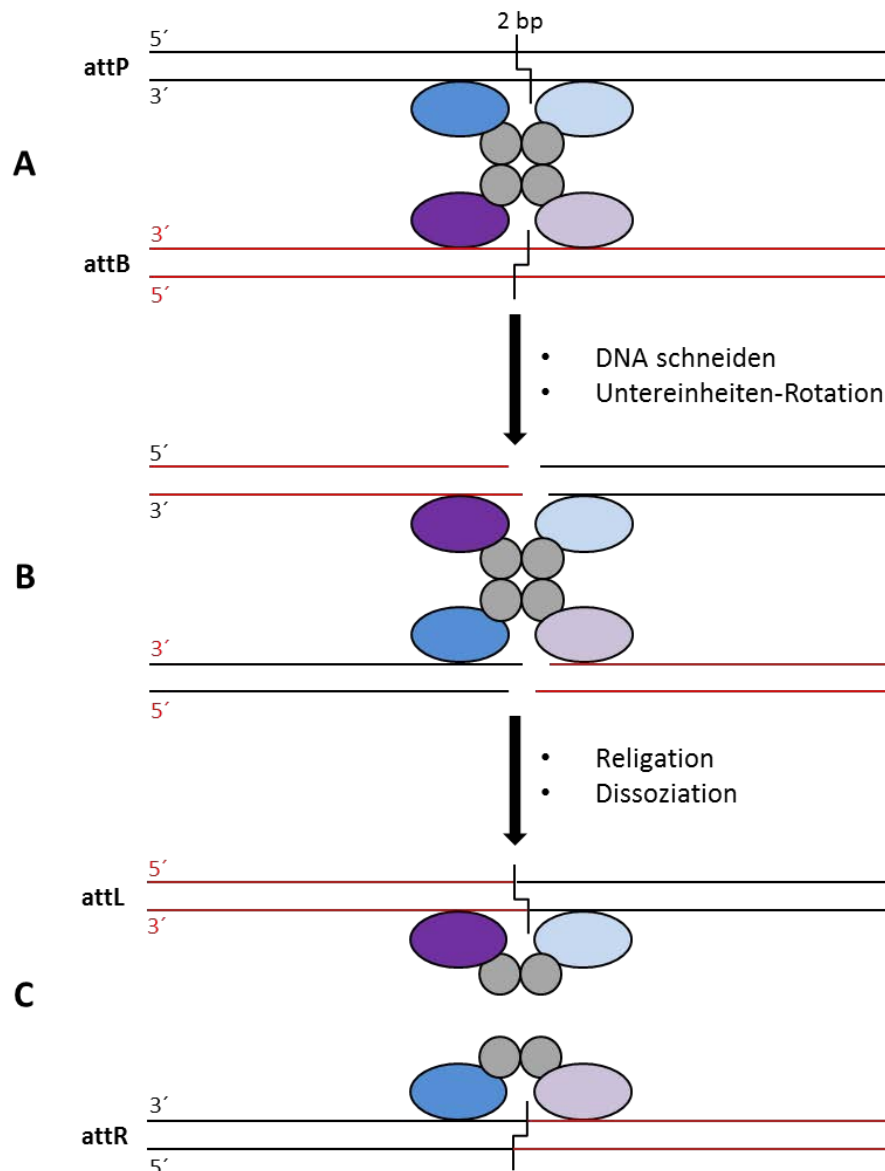


Abbildung 4: Mechanismus der ortsspezifischen Rekombination mittels  $\Phi C31$ .

**A** Bindung der Integrase an die jeweiligen *att*-Sequenzen (*attP* und *attB*) unter Bildung einer Synapsenstruktur.

**B** Synchroner Schnitt aller 4 DNA-Stränge innerhalb der Crossover-Site unter Bildung einer Phosphoserin-Brücke zwischen den 5'Phosphat-DNA Enden und eines Serin-Restes der Integrase (S10). Reziproker Strangaustausch infolge einer 180° Rotation von 2 Integrase-Untereinheiten.

**C** Religation der reziproken DNA-Stränge unter Bildung der Rekombinationsprodukte *attL* und *attR* und deren abschließende Dissoziation.



## 1.5 Gegenstand der Arbeit

Bislang sind durch wenige Einzelstudien, aber vorallem durch genomweite Ansätze chromosomale Domänen hinsichtlich ihres globalen Aufbaus, der Proteinbindung und Chromatinstruktur, und der räumlichen Abfaltung mehr oder weniger detailliert beschrieben worden. Untersuchungen ergaben wertvolle Hinweise auf die mögliche Funktion der beteiligten Komponenten. Derzeit gibt es aber noch kein experimentelles System mit dem es möglich ist mit einem unvoreingenommenen Ansatz die Eigenschaften spezifischer Domänen zu untersuchen und somit die aus den globalen Ansätzen gewonnenen Hinweise direkt zu überprüfen.

In meiner Arbeit versuche ich ein solches experimentelles System zu etablieren. Nachfolgend sind die Ziele meiner Arbeit dargestellt:

- 1.) Es soll eine Rekombinationskassette in kondensierter Abschnitte des Genoms von *Drosophila* eingefügt werden, die es erlaubt die Voraussetzungen für die Bildung offener Chromatindomänen zu testen.
- 2.) Über sequenzspezifische Rekombination (PhiC31) sollen ausgewählte DNA-Abschnitte der Interbandenregion 61C7/8 gezielt in diese Rekombinationskassette im Genom von *Drosophila* eingefügt werden.
- 3.) Der lokale Effekt auf die Chromatinstruktur sowie auf Proteinbindungen an der ektopischen Position sollen mit dem endogenen 61C7/8 Locus verglichen werden.
- 4.) Durch Varianten der inserierten 61C7/8 DNA soll nach DNA Abschnitten gesucht werden, die essentiell für die Bildung offenen Chromatins sind.

Als Ergebnis hoffe ich Hinweise auf den Mechanismus zu erhalten, wie über DNA Elemente, daran bindende Proteine und deren etablierte Histonmodifikationen die transkriptionelle Aktivität und offene Struktur von Chromatindomänen reguliert bzw. gebildet werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische und genetische Standardmethoden

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Sämtliche Enzyme und Reagenzien wurden von Thermo Scientific (Fermentas) und New England Biolabs (NEB) bezogen. Die Oligonucleotide für die jeweiligen PCR's wurden bei der Firma TIB MOLBIOL oder SMB synthetisiert und sind in Tabelle 1 aufgelistet. Molekularbiologische Standardkits wurden von den Firmen Qiagen, Peqlab und ZymoResearch unter Verwendung der beiliegenden Herstellerprotokolle durchgeführt. Die Generierung der DNA-Sonden für die in situ Hybridisierung erfolgte mit Hilfe des Biotin-Nick Translation Mix (BNT-MIX) der Firma Roche. Zur Anfärbung der DNA sowohl für die in situ Hybridisierung als auch für die Immunfärbung wurde der Hoechst-Farbstoff H33258 (Bisbenzimidin H 3xH<sub>2</sub>O) der Firma Serva genutzt. Die hybridisierten Biotin-markierten DNA-Proben wurden mit Anti-Biotin Streptavidin TR von der Firma Invitrogen angefärbt. Für die quantitative Real-time PCR wurden die Zielsequenzen mittels dem Power SYBR Green PCR Master Mix von Applied Biosystems amplifiziert. Die Herstellung von Puffern und Lösungen erfolgte unter Verwendung der dem Labor zur Verfügung stehenden Chemikalien der Firmen MERCK, SERVA und ROTH. Alle mikroskopischen Auswertungen erfolgten unter Nutzung des Delta Vision Spectris Optical Sectioning Microscope (OSM).

#### 2.1.2 Oligonucleotide

Folgende Oligonucleotide wurden für Klonierung, inverse PCR, qRT-PCR und diagnostische Test-PCR verwendet:

Tabelle 1

Name	Sequenz 5'-3'	Bemerkungen
pUAST-NattBw		
N3,9-F	acgccgcggattatatatctgttgat	- über Sac2/BamH1 (~3,9 kb) - Notch-Bandensequenz
N3,9-R	acgggatccgtgggttattttactttg	

N5,1-F	acgggatccccgagatccaagagtctta	- über BamH1/Sma1 (~5,1 kb)
N5,1-R	acgccccgggaatgagaaaattacacgc	- Notch-Bandensequenz
N4,0-F	acggaattcacatttaacttgccag	- über EcoR1/Xho1 (~4,0 kb)
N4,0-R	actggtaccacataccgaacaagcagc	- Notch-Bandensequenz
WattB-F	acggaattcgtcgacgatgtaggtca	- über EcoR1 (~4,5 kb)
WattB-R	acggaattcagtagcgaatgcgtcgtt	- white-Reportergen, Bandensequenz, attB-Seite
pattP61Cdp		
61Cp-F	acgggtaccattcgctctttcagcg	- über HindIII/Kpn1 (~4,0 kb)
61Cp-R	acgaagcttagtagccgccctgaaaag	- prox. Fragment der 61C7/8 Interbande
61Cd-F	acggagctcctttgccatcgaatcgg	- über Sac1/Kpn1 (~5,0 kb)
61Cd-R	acgggtaccatgtg gtcagcatcggc	- dist. Fragment der 61C7/8 Interbande
GFP-F	catgcggccgcctcaagcttcaattctgca	- über Not1 (~1,0 kb)
GFP-R	aatgcggccgcacatctagagtcgcgccgct tt	- UAS/GFP-Reportergen
pattP61C $\Delta$ P1/ $\Delta$ P2/ $\Delta$ P1+2		
61C $\Delta$ P1-F	caaaatgtggaaatacgggtcaa	- 5'-phosphoriliert für blunt-end Ligation
61C $\Delta$ P1-R	ataatggttttagtgaatgggta	- prox. 61C7/8 mit deletiertem Promoter 1 (~490 bp)
61C $\Delta$ P2-F	atcgataaatgattgaggaag	- 5'-phosphoriliert für blunt-end Ligation
61C $\Delta$ P2-R	tgtttggaatgtttcttagtt	- prox. 61C7/8 mit deletiertem Promoter 2 (~160 bp)
pattP3C		
3C-F	atagggcccttctgattcaagcgggtg	- über Apa1/Xho1 (~2,6 kb)
3C-R	acgctcgagactcggcttctgctcactc	- 3C6/7 Interbandensequenz
GFP-F/R	siehe Konstrukt pattP61C	
inverse PCR		
Pry1	ccttagcatgtccgtggggttgaat	- inverse PCR
Pry4	caatcatatcgctgtctcactca	- für das terminale 3'-P-Element (PEP)
Plac1	caccaaggctctgctcccacaat	- inverse PCR
Pwht1	gtaacgctaatactccgaacagggtca	- für das terminale 5'-P-Element (PEP)

5'Sp1	acacaaccttctctcaacaa	- Sequenzierprimer für Plac1/Pwht1-Fragment
3'Spep1	gacactcagaataactattc	- Sequenzierprimer für Pry4/Pry1-Fragment
qRT-PCR		
qGFP-F	aggagcgcaccatcttcttc	- für Quantifikation der GFP-Expression - 119 bp Fragment
qGFP-R	gtcctcctgaagtcgatgc	
qRev1-F	tgtgagcggataacaatttca	- für Quantifikation der Rev1-Expression - 100 bp Fragment
qRev1-R	cattgtacataaaccaaactgc	
qAct-F	agcggataactagaactactcc	- endogene Kontrolle für alle qRT-PCR's - 91 bp (cDNA), 245 bp (gen. DNA)
qAct-R	ctaaagctgcaacctcttcgt	

### 2.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper und eingesetzte Verdünnungen wurden für die immunzytologische Analyse benutzt:

Tabelle 2

Name	Tier	Quelle	Verdünnung	Bemerkungen
primäre Antikörper				
anti-Chriz	Kaninchen	Biogenes	1:1000	Kaninchen Antiserum
anti-Jil1	Kaninchen	Biogenes	1:1000	Kaninchen Antiserum
anti-CP190	Maus	Biogenes	10µg/ml	monoklonaler Ak Bx63 Zellkulturüberstand Maus
anti-BEAF	Kaninchen	Biogenes	1:1000	Kaninchen Antiserum
anti-Z4	Kaninchen	Biogenes	1:1000	Kaninchen Antiserum
anti-RNAPol2	Maus	Prof. Ana Pombo (MDC)	1:750	Maus Antiserum

sekundäre Antikörper					
Alexa Fluor 555.1	Ziege	Invitrogen	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) A21428	
Alexa Fluor 488.1	Ziege	Invitrogen	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) A11070	
Alexa Fluor 555.2	Ziege	Invitrogen	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) A21422	
Alexa Fluor 488.2	Ziege	Invitrogen	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) A11017	

#### 2.1.4 Bakterienstämme

Sowohl für die Synthese von Plasmid-DNA im Mini- oder Midi-Maßstab als auch zum Zwecke des Klonierens wurde das „Z-competent E-coli Transformation Kit & Buffer Set“ (Zymo Research) in Verbindung mit dem *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue (recA1 endA, gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1, lac [F', proAB, lacIqZDM15, Tn10 (Tetr)]c) verwendet.

#### 2.1.5 Fliegenstämme

Die in dieser Arbeit genutzten Fliegenstämme unter Angabe der jeweiligen Mutationen und des Verwendungszweckes sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 3

Name	Marker	Chr.	Bemerkungen
WT-Oregon R	/	/	- Wildtyp
Tft/Cyo	- „curly“ Flügel (Cyo) - „tufted“ Borsten (Tft)	2	- Balancer für 2. Chr.
TM3/TM6	- „tubby“ Larven (TM6) - „stubble“ Borsten	3	- Balancer für 3. Chr.

	(TM3) - in Kombination „ebony“		
FM7	- „bar“ Augen (FM7) - „forked“ Borsten (FM7)	X	- Balancer für X-Chr.
Δ2-3Ki	- „kinked“ Borsten (Ki)	3	- Transposasequelle in Keimbahn und somatischen Zellen aktiv - regulatorisches zweites Intron deletiert
G231.1- GAL4	- rote Augen (mini- white <sup>+</sup> )	2	- GAL4-Treiberlinie spezifisch für Spei- chel drüsen
G61-GAL4	- rote Augen (mini- white <sup>+</sup> )	X	- GAL4-Treiberlinie spezifisch für Spei- chel drüsen
Δfa(swb)	- rote Augen (mini- white <sup>+</sup> )	X	- für 3C6/7 Amplifikation mit fa(swb) Mutation (pattP3CΔfa <sup>swb</sup> )
Bloomington #23649	- GFP im Nervensys- tem (Larven), Augen (Adult)	4	- ΦC31 Integrase exprimiert unter vasa Promoter
w1118	- weiße Augen (white <sup>-</sup> )	X	- für P-Element vermittelte Keimbahn- transformation

## 2.2 Konstruktion von Plasmidvektoren

### 2.2.1 Konstruktion von pUAST-NattBw

Für die Assemblierung des Notch-white Banden-Konstrukts (pUAST-NattBw) wurden zufällig ausgewählte Notch-Sequenzen mittels PCR aus genomischer DNA von *Drosophila* amplifiziert und in den Vektor pBluescript in nachstehender Reihenfolge kloniert. Das 3,9 kb große Sac2/BamH1 Notch-Fragment wurde unter Verwendung der Primer N3,9-F/N3,9-R kloniert. Die Klonierung des 5,1 kb großen BamH1/Sma1 Notch Fragments erfolgte mit Hilfe der Primer BamH1/Sma1 und für das 4,0 kb große EcoR1/Xho1 Notch Fragment wurden die Primer N4,0-F/N4,0-R genutzt. Das white-attB Fragment, welches neben der Bandengenerierung auch als Reportergen funktioniert und die attB-Kassette zur Verfügung stellt, wurde aus pUASTB (Groth et al., 2004) mittels der Primer WattB-F/WattB-R amplifiziert und über EcoR1 kloniert. Die gesamte Vektorsequenz (~17,3 kb) bestehend aus drei Notch-Sequenzen und einer white-attB Sequenz wurde mittels Kpn1/Sph1 Verdau aus dem pBluescript Vektor herausgeschnitten und in den Vektor pUAST hineinkloniert.

### 2.2.2 Konstruktion von pattP61Cdp

Für die Konstruktion des Interbanden Vektors pattP61Cdp wurde das proximale und das distale Ende der 61C7/8 Interbande aus der genomischen DNA von *Drosophila* mittels PCR amplifiziert und in den pTAattP Vektor (Groth et al., 2000) in nachstehender Reihenfolge kloniert. Das 4 kb große proximale 61C7/8 DNA Fragment wurde mit Hilfe der Primer 61Cp-F/61Cp-R amplifiziert und über HindIII/Kpn1 kloniert. Darauf folgend wurde das 5 kb große distale 61C7/8 DNA Fragment unter Verwendung der Primer 61Cd-F/61Cd-R über Sac1/Kpn1 kloniert. Das UAS/GFP Reportergen wurde mit den Primern GFP-F/GFP-R aus dem Vektor pUAS-GFP amplifiziert und über Not1 kloniert. Das in diesem Klonierungsablauf erhaltene pTAattP-Zwischenprodukt, welches lediglich das proximale Fragment trägt diente später als DNA-Probe für die in 3.2.2 beschriebene Test in-situ Hybridisierung.

### 2.2.3 Konstruktion von pattP61C $\Delta$ d und pattP61C $\Delta$ p

Die Generierung der pattP61C $\Delta$ d/- $\Delta$ p Deletionskonstrukte erfolgte durch Ausschneiden spezifischer Fragmente innerhalb des 61Cdistalen bzw. 61Cproximalen Bereichs mittels Restriktionsverdau und darauffolgender Religation. Im Falle der ~2,7 kb großen distalen Deletion erfolgte dies über einen Hpa1/BstZ17I Verdau und für die ~2,3 kb große proximale Deletion über einen SnaB1/Swa1 Verdau. Die Auswahl der deletierten Bereiche erfolgte auf Basis der modENCODE Analyse hinsichtlich spezifischer molekularer Eigenschaften innerhalb der proximalen bzw. distalen 61C7/8 Region (z.B. Proteinbindungen und Histon-Modifikationen).

### 2.2.4 Konstruktion von pattP61C $\Delta$ P1, pattP61C $\Delta$ P2 und pattP61C $\Delta$ P1+2

Die spezifische Deletion potentieller Promoterbereiche im gentragenden proximalen 61C7/8 Fragment erfolgte unter Zuhilfenahme des „McPromoter Prediction Server“ und des „Promoter 2.0 Prediction Server“. Aufgrund der Vorhersagen dieser zwei Programme erfolgte die Deletion von zwei potentiellen Promotersequenzen. Für die Entfernung des Promoter 1 wurde mit Hilfe der 5'phosphorilierten Primer 61C $\Delta$ P1-F/61C $\Delta$ P1-R die gesamte Sequenz des pattP61Cdp Vektors mit Ausnahme des Promoterbereichs amplifiziert und folgend „blunt-end“ religiert. Nach dem gleichen Vorgehen erfolgte auch die Deletion des Promoter 2 unter Verwendung der Primer 61C $\Delta$ P2-F/61C $\Delta$ P2-R. Für die Konstruktion des Vektors, welcher in beiden Promotersequenzen deletiert ist, diente das Konstrukt mit der Promoter 1 Deletion als Matrice für die Promoter 2 Deletion.

### 2.2.5 Konstruktion von pattP3C und pattP3C $\Delta$ fa(swb)

Für die Assemblierung des 3C6/7 tragenden Interbandenkonstrukts pattP3C wurde das ~2,6 kb große 3C6/7 Fragment aus genomischer *Drosophila* DNA unter Verwendung der Primer 3C-F/3C-R amplifiziert und folgend über Apa1/Xho1 in den pTAattP Vektor kloniert. Das Einfügen des UAS/GFP Reportergens erfolgte wie auch für das 61C7/8 Konstrukt mit Hilfe der Primer GFP-F/GFP-R über Not1. Für die Generierung des pattP3C $\Delta$ fa(swb) Konstrukts, welches in der fa(swb) Sequenz deletiert ist, wurde



die Interbandensequenz aus genomischer DNA der *fa(swb)* *Drosophila*-Mutante amplifiziert und über die gleichen Restriktionsstellen kloniert wie bei pattP3C.

#### 2.2.6 Konstruktion von pattPNw-co und pattPempty-co

Das pattPempty-co Kontrollkonstrukt wurde assembliert durch Klonierung des Not1 UAS/GFP Reportergenfragments in den pTAattP Vektor unter Verwendung der Primer GFP-F/GFP-R. Für den Kontrollvektor pattPNw-co wurde mittels Sac1 Restriktionsverdau ein ~5,6 kb großes Notch-Fragment aus dem Bandenvektor pUAST-NattBw herausgeschnitten und in den pattPempty-co Vektor kloniert. Anschließend wurde ein ~4,7 kb großes Notchfragment kloniert welches mittels BstZ17I abermals aus pUAST-NattBw herausgeschnitten wurde.

#### 2.3 Anzucht und Haltung der Fliegen

Die Anzucht und Haltung der *Drosophila* Stämme erfolgte auf einem Standardmedium. Dazu wurden 85 g Agar mit 8 l Leitungswasser aufgekocht und 766 g Maisschrot hinzugegeben. In zusätzlichen 2 l Leitungswasser wurden 100 g Sojamehl, 180 g Trockenhefe, 408 g Zuckerrübensirup und 816 g Malzextrakt gelöst und folgend zu der Agarlösung gegeben. Nachdem das Gemisch aufgekocht wurde, ließ man es auf ca. 70 °C abkühlen und um Bakterienwachstum zu verhindern wurden 6 g Nipagin (gelöst in 10 ml Ethanol) sowie 45 ml Propionsäure hinzugefügt. Die etablierten Fliegenstämme wurden für gewöhnlich bei 18 °C und Fliegenkreuzungen bei 25 °C gehalten. Zum Zwecke der Keimbahntransformation wurden Embryonenablagen auf einem speziellen Traubensaftagarmedium angesetzt. Das Saftmedium wurde wie folgt hergestellt. In 250 ml Wasser werden 10 g Agar, 83,25 ml Traubensaft und 4,15 g Saccharose hinzugegeben und in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem das Medium auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurde es um Bakterien und Pilzbefall zu verhindern mit 0,9 g Nipagin versetzt und in kleine Petrischalen gegossen. Für Embryonenablagen bzw. Einzelkreuzungen wurde dem entsprechenden Medium zusätzlich Bäckerhefe zugegeben.

## 2.4 P-element vermittelte Keimbahntransformation

Die Generierung transgener Fliegenlinien erfolgte durch DNA-Injektion in den posterioren Pol 0-30 min alter dechorionisierter Fliegenembryonen mittels einer Glaskapillare nach der Methode von Rubin und Spradling (1982). Die Entfernung des Chorions erfolgte durch eine 3 minütige Inkubation der Embryonen in einer Lösung aus Embryosaline und handelsüblichen Klorix-Reiniger im Verhältnis 1:1. Im Falle der P-Element vermittelten Keimbahntransformation wurde die P-Element Plasmid DNA (pUAST-NattBw) zusammen mit einem Transposase kodierenden Helfer-Plasmid (P $\pi$ 25.7wc) in isogenisierte w<sup>1118</sup> Embryonen coinjiziert. Für die rekombinative  $\Phi$ C31 Transformation wurde die transgene Rezipientenlinie (Linie #42) mit einer  $\Phi$ C31-Integrase kodierenden Fliegenlinie (Bloomington #23649) gekreuzt und deren heterozygote, embryonalen Nachkommen für die Injektion genutzt. Dafür wurde lediglich das zu rekombinierende Interbanden- bzw. Kontrollkonstrukt injiziert.

## 2.5 Herstellung von Quetschpräparaten polytärer Chromosomen

Für die Herstellung von Quetschpräparaten polytärer Chromosomen wurden die Speicheldrüsen von Fliegenlarven des dritten Stadiums in einer 10 % Triton X-100/1x Puffer A Lösung präpariert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss und die Fixierung für 3 min in einer 40 % Essigsäure Lösung + 3,7 % Formaldehyd auf einem 18x18 mm Deckgläschen. Folgend wurden die Chromosomen auf einem Objektträger durch mehrmaliges Gleiten, Klopfen und Drücken des Deckgläschens gespreitet und nach einer Qualitätsprüfung unter dem Mikroskop in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Deckgläschen konnte dadurch mit einem Skalpell vom Objektträger abgesprengt werden und das Präparat wurde bei 4 °C in 96 % Ethanol gelagert.

## 2.6 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) von Polytänchromosomen

Die für die FISH genutzten Quetschpräparate von polytänen Chromosomen wurden wie in 2.5 erläutert hergestellt. Die DNA-Probe wurde mit Hilfe des Biotin-Nick Translation Mix (BNT-Mix) von Roche nach Herstellerangaben synthetisiert und folgend auf optimale Fragmentgröße (200-500 bp) und Biotinmarkierung gelelektrophoretisch bzw. per DotBlot getestet. Zur Dehydrierung der in 96 % Ethanol gelagerten

Quetschpräparate, wurden sie für 4 min in eine Küvette mit 96 % Ethanol absolut gestellt und luftgetrocknet. Anschließend überführte man die Präparate für 3 min in einen Denaturierungsansatz, welcher im 73 °C Wasserbad vorinkubiert worden war. Dann erfolgte eine 3-minütige Inkubation der Präparate in 2x SSC (auf Eis vorinkubiert) mit einer anschließenden Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 % und 96 % Ethanol). Nachdem die Objektträger vollständig luftgetrocknet waren, wurden die Präparate mit 40 µl Biotin markierter und vorher denaturierter DNA-Probe (3 min bei 100 °C) in feuchten Kammern über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Waschschrift der Präparate in 2x SSC (bei RT), um ungebundene Nucleotide zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger für 4 min in 0,4x SSC/ 0,1 % Triton (bei 73 °C) und 30 sec in 2x SSC/ 0,1 % NP40 (bei RT) gewaschen. Nach einer jeweils 10-minütigen Inkubation in 1x PBS/ 0,1 % Triton sowie in 1x PBS, wurde jedes Präparat mit 30 µl Streptavidin/ BSA-Lösung für 2,5 h im Dunkeln angefärbt. Im Anschluss der Färbung wurden sie für 10 min in 1x Puffer A gewaschen und die DNA für 14 min in Hoechst/ Puffer A (1:40000) gefärbt. Die Präparate wurden dann sofort (ohne Trocknung) in 87 % Glycerol/ 5 % n-Propylgallat eingebettet.

## 2.7 Immunmarkierung von Polytänchromosomen

Die für die Immunfärbung genutzten Quetschpräparate von polytänen Chromosomen wurden wie in 2.5 erläutert hergestellt. Die in 96 % Ethanol gelagerten Präparate wurden zweimal für je 10 min in Puffer A gewaschen und anschließend mit 30 µl primären Antikörper (Tabelle 2) in feuchten Kammern bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach zwei 10 minütigen Waschschriften in Puffer A erfolgte die Inkubation der Präparate mit 30 µl sekundärem Antikörper (Tabelle 2) in feuchten Kammern bei RT für 3 Stunden. Folgend wurden die Präparate weitere zwei mal für je 10 min in Puffer A gewaschen und die DNA für 14 min in Hoechst/ Puffer A (1:40000) gefärbt. Die Präparate wurden dann sofort (ohne Trocknung) in 87% Glycerol/ 5% n-Propylgallat eingebettet.

## 2.8 Isolation von Gesamt-RNA und quantitative RT-PCR

Die Speicheldrüsen von 30 Larven des dritten Stadiums wurden präpariert und deren Gesamt-RNA nach dem „two-step TRIZOL RNA isolation“ Protokoll (W.M. Keck Foundation Biotechnology Microarray Resource Laboratory) isoliert. Die Synthese der entsprechenden cDNA erfolgte mit Hilfe der RevertAid Premium Transcriptase (Fermentas) nach Herstellerangaben, welche anschließend als Matrize für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) genutzt wurde. Die qRT-PCR wurde mit StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) durchgeführt unter Nutzung von „Two-Step Power SYBR Green PCR Master Mix“ (Applied Biosystems). Für die jeweiligen Expressionsanalysen wurden spezifische Primer für die entsprechenden Gene gewählt und als endogene Kontrolle Actin 42 A genutzt (Primer in Tabelle 1). Die Parameter der PCR-Zyklen waren wie folgt: 10 min/95 °C, 40 Zyklen je 15 sek/95 °C und 1 min/60 °C.

## 2.9 modENCODE Analyse

Die modENCODE Datenbank ([www.modencode.org](http://www.modencode.org)) wurde genutzt zur Analyse der Interbanden-Regionen 61C7/8 bzw. 3C6/7 als auch des P-Element Insertionslocus 21F3-22A1-2 auf deren spezifische molekulare Eigenschaften (z.b. Proteinbindungen und epigenetische Modifikationen).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung einer kondensierten Chromatin-Domäne mit interner attB-Rekombinationssequenz

Für die Untersuchung der Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierter Chromatin-Domänen auf zytologischer und molekularer Ebene war die Etablierung eines Test-Systems erforderlich, welches die gezielte Insertion von DNA-Sequenzen innerhalb einer definierten chromosomalen Region ermöglicht. Zu diesem Zweck sollte zunächst mittels P-Element vermittelter Keimbahntransformation und P-Element Mobilisation eine attB Rekombinationskassette innerhalb einer natürlich vorkommenden Bandenregion erzeugt werden. Die von mir generierten 24 transgenen Linien wiesen allesamt Insertionen innerhalb dekondensierter Interbanden-Domänen auf und waren demzufolge unbrauchbar für zytogenetische Analysen. Aufgrund der hohen Präferenz von P-Elementen in leichter zugängliche und demnach dekondensierte chromosomale Regionen zu integrieren, war es mir auf diesem Wege nicht möglich, eine P-Element Insertion und damit eine Rekombinationskassette innerhalb einer kondensierten Chromatin-Domäne (Bande) zu erzeugen. Aus diesem Grund wurde die Strategie zur Etablierung eines Testsystems für chromosomale Strukturanalysen geändert. Dazu sollte das kondensierte Chromatin, welches die attB-Rekombinationssequenz beidseitig flankiert, künstlich geschaffen werden und dabei auch auf zytologischer Ebene mikroskopisch auswertbar sein (Abb. 5). Die dadurch in einem definierten genetischen Umfeld liegende attB Rekombinationssequenz kann anschließend für die gezielte Insertion von DNA-Sequenzen aus dekondensierten Chromosomenabschnitten genutzt werden (Abb. 5a). In meiner Studie wurden dafür spezifische Interbandensequenzen bzw. deren Deletionsderivate verwendet. Die gezielte Insertion dieser Sequenzen diente der Untersuchung auf autonome Bildung dekondensierter Chromatinstrukturen sowie der Kartierung essentieller Sequenzabschnitte zur Bildung dieser Strukturen.

Für die ektopische Bildung einer kondensierten Chromatinstruktur wurde ein P-Element Vektor konstruiert (pUAST-NattBw), welcher neben einer attB-Rekombinationssequenz auch DNA-Sequenzen des Notch- und des white-Lokus enthält. In Speicheldrüsen von Drosophila-Larven sind die von mir gewählten Notch- bzw. white-Sequenzen nicht transkribiert und bilden kondensiertes Chromatin (Ban-

den). Insgesamt wurden ~21 kb von Banden generierenden DNA-Sequenzen in den P-Element Vektor integriert. Diese bestanden aus ~9 kb Notch-Sequenzen welche sich 5' der attB-Rekombinationssequenz befinden und ~12 kb *white*/Notch-Sequenzen am 3' Ende der attB-Rekombinationssequenz (Abb. 1b; Details zur Klonierung siehe 2.2.1). Das fertige P-Element Konstrukt wurde mit Hilfe eines Transposase kodierenden Helferplasmids in die Keimbahn von  $w^{1118}$  Fliegenembryonen transformiert und anschließend anhand des *white*<sup>+</sup>-Augenmarkers auf genomische Integration gescreent .

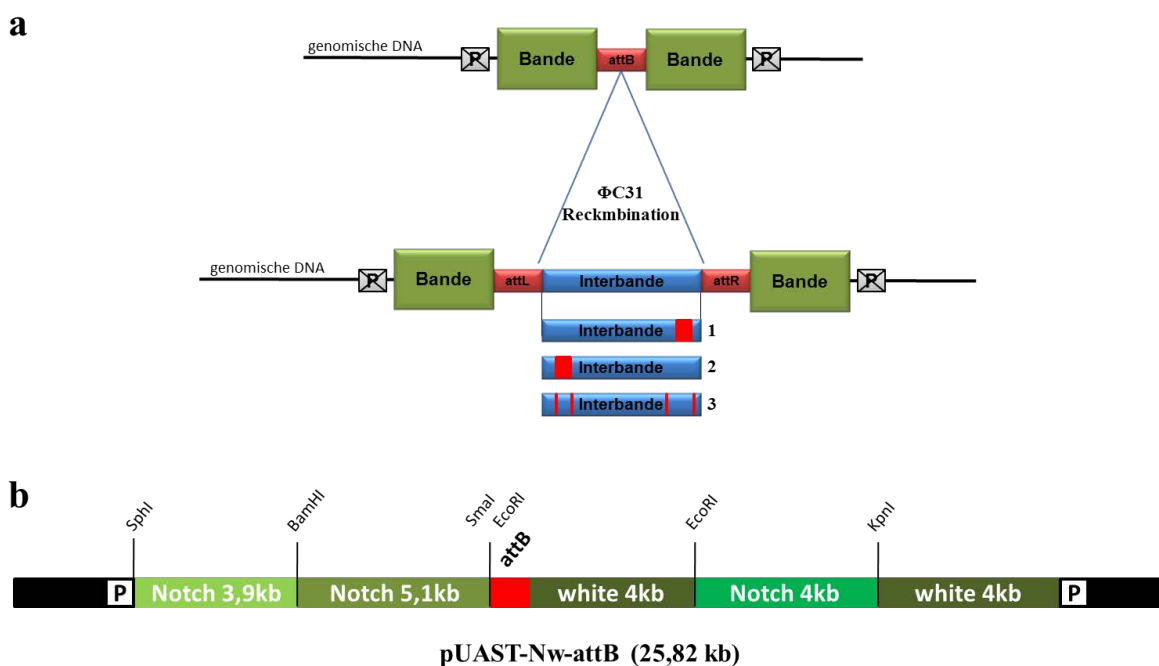


Abb.5: Modell der Etablierung einer künstlichen kondensierten Domäne mit einer zentralen Rekombinationskassette. a) oben: Schematische Ansicht der durch P-Element Insertion erzeugten ektopischen kondensierten Chromatindomäne (Grün) mit einer darin befindlichen attB Rekombinationssequenz (Rot). a) unten: Aufspaltung der ektopischen Chromatindomäne nach gezielter Insertion von Interbandensequenzen (Blau) mittels der  $\Phi$ C31 Rekombinase. Dabei entstehen die inaktivierten attL/R-Produkte (Rot), welche die Rekombination unidirektional machen. Insertion von Varianten der Ausgangssequenz, z.B. lokal deletierten bzw. mutierten DNA-Fragmenten (1,2 und 3) erlauben die Kartierung essentieller DNA-Sequenzen für die autonome Bildung dekondensierten Chromatins. b) Schematische Darstellung des P-Element Vektors (pUAST-NattBw) zum Zweck der Generierung einer ektopischen kondensier-

*ten Chromatindomäne. Dieser P-Element Vektor enthält DNA-Sequenzen die kondensiertes Chromatin bilden (Notch und white) mit einer zentralen attB Rekombinationssequenz.*

### 3.1.1 Der P-Element Vektor integriert an vielen Stellen im Genom

Die durch Keimbahntransformation des P-Element Vektors pUAST-NattBw gewonnenen 43 transgenen P-Element Insertionslinien, wurden auf die genomischen Insertionsorte mit Hilfe von inverser PCR untersucht. Anhand von FlyBase Sequenzdaten konnten diesen Insertionsorten die entsprechenden genomischen und chromosomalen Regionen zugeordnet werden und gleichzeitig auch ihre Lage relativ zu angrenzenden Genen bestimmt werden (Tabelle 1). Auf diese Weise konnten 42 von 43 Linien molekulargenetisch kartiert werden. Bei der Linie 10 war es mir nicht möglich über inverse PCR ein Produkt für die genomische Kartierung zu etablieren. Diese Linie konnte demnach lediglich mit Hilfe von FISH zytologisch kartiert werden. In der Gesamtheit der kartierten Linien zeigt sich ein breit gestreutes P-Element Insertionsmuster auf allen chromosomalen Armen (Abb. 16 im Anhang). In zwei Fällen gab es zufällige P-Element Insertionen die unabhängig voneinander in den selben chromosomalen Locus inserierten. Dies war zum einen der Locus 13.246.083 auf dem 2L Chromosom (#24 und #30) und zum anderen der Locus 19.973.918 auf dem 3L Chromosom (#5,#13 und #40).

Tabelle 4

Linie	P-Element Insertion			angrenzende Gene	FISH
	Chromosom	Bandenregion	gen. Position		
1	2R	44A2	3877265	Nup44A	X
2	2R	53F7-8	12985003	CG8938	
3	3R	88E1-2	10902963	CG33485	
4	2R	47A9-11	6363074	CG12891	
5	3L	69B3	12384655	Ncc69	X
6	3L	68A4	11063645	CG33048	
7	X	9F5	10751387	CG1655	
8	X	6C1-3	6496378	CG3973	
9	2L	21C2	452675	CG4280	X
10	2R	43D			X
11	3L	71B4	15088259	CG6945	X
12	3L	77C4	20466418	CG32428	
13	3L	69B3	12384655	Ncc69	X
14	2R	57A9-10	16555699	CG8994	
15	X	18F4-19A2	19781161	CG32529	X
16	2R	49B5-7	8476680	CG8851	
17	X	1E1-3	1028322	CG3655	X
18	2R	57D5-6	17164941	Rgk3	
19	3R	90B5	13392828	CG34419	
20	3R	88C10	10485183	CG3505	X
21	2R	51D1	10769027	CG10246	
22	3L	67B10	9480850	CG32036	
23	3R	98B5	23731562		
24	2L	34B1	13246074	CG16820	
25	3R	88E10-11	7394886	CG14705	X
26	X	12E8-10	14216245	CG32600	X
27	X	6C1	6484851	Pat1	X
28	X	3A6	2482598	CG9659	
29	2R	44E3-4	4623285	CG8740	X
30	2L	34B1	13246083	CG16820	
31	3R	99E4-F1	26119953	CG15532	X
32	3R	84F16-A2	4303342	PQBP-1	
33	3L	75C1	18456346	CG4306	X
34	X	9A3	9824997	idgf4	X
35	X	14A8-9	15985769	CG9214	
36	3R	88E5-6	11075733	CG6499	
37	X	11F1-3	13290901	CG1673	
38	3L	67C1	9540029	CG42673	
39	X	16B3-4	17455758	CG12432	
40	3L	69B3	12384645	Ncc69	
41	2R	60B9	19973918	CG16786	
42	2L	21F3-22A1	1177706	CG4896	X
43	2L	37C1-6	19158091	CG10719	



### 3.1.2 Die P-Element Vektoren integrieren präferentiell in offenes Chromatin und bilden ektopische Banden

17 der durch inverse PCR genomisch kartierten Linien wurden zusätzlich mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) an polytären Chromosomen zytologisch kartiert. Bei 16 der in-situ analysierten Linien waren die P-Elemente in dekontensierten Interbandendomänen inseriert. In diesen Fällen konnten die Insertionen eindeutig als ektopische Banden-Domänen in den jeweiligen Interbanden detektiert werden. Das Hybridisierungssignal zeigte dabei eine klare Überlappung mit der ektopisch gebildeten Bande. Bei der Linie 17 wurde das P-Element in eine komplexe bandenreiche Region integriert, so dass eine neu gebildete kondensierte Domäne nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Die Erzeugung von unabhängigen, künstlichen Banden-Domänen innerhalb von Interbanden lässt darauf schließen, dass in den genutzten Notch/white-Sequenzen des pUAST-NwattB Vektors alle notwendigen Informationen für die autonome Bildung und Aufrechterhaltung kondensierten Chromatins vorhanden sind. In Abb. 6 sind beispielhaft zwei der insgesamt 43 unabhängigen P-Element Linien (#42 und #5) dargestellt.

Für die nachfolgenden Experimente und Untersuchungen wurde die Linie #42 genutzt, welche die P-Element Insertion am distalen Ende des 2L Chromosoms in der zytologisch gut auswertbaren Interbandenregion 21F3-22A1-2 trägt. Molekular wurde die Insertionsstelle mittels inverser PCR an Position 2L:1.177.706 kartiert, welche sich 117 bp „downstream“ des Gens CG4887 und innerhalb der 5'UTR des Gens CG4896 befindet. Beide Gene sind nach Informationen von FlyBase in Larven des dritten Stadiums transkriptionell schwach bis gar nicht aktiv. Dies lässt darauf schließen, dass diese Interbandenregion durch einen transkriptionell unabhängigen Prozess gebildet wird.

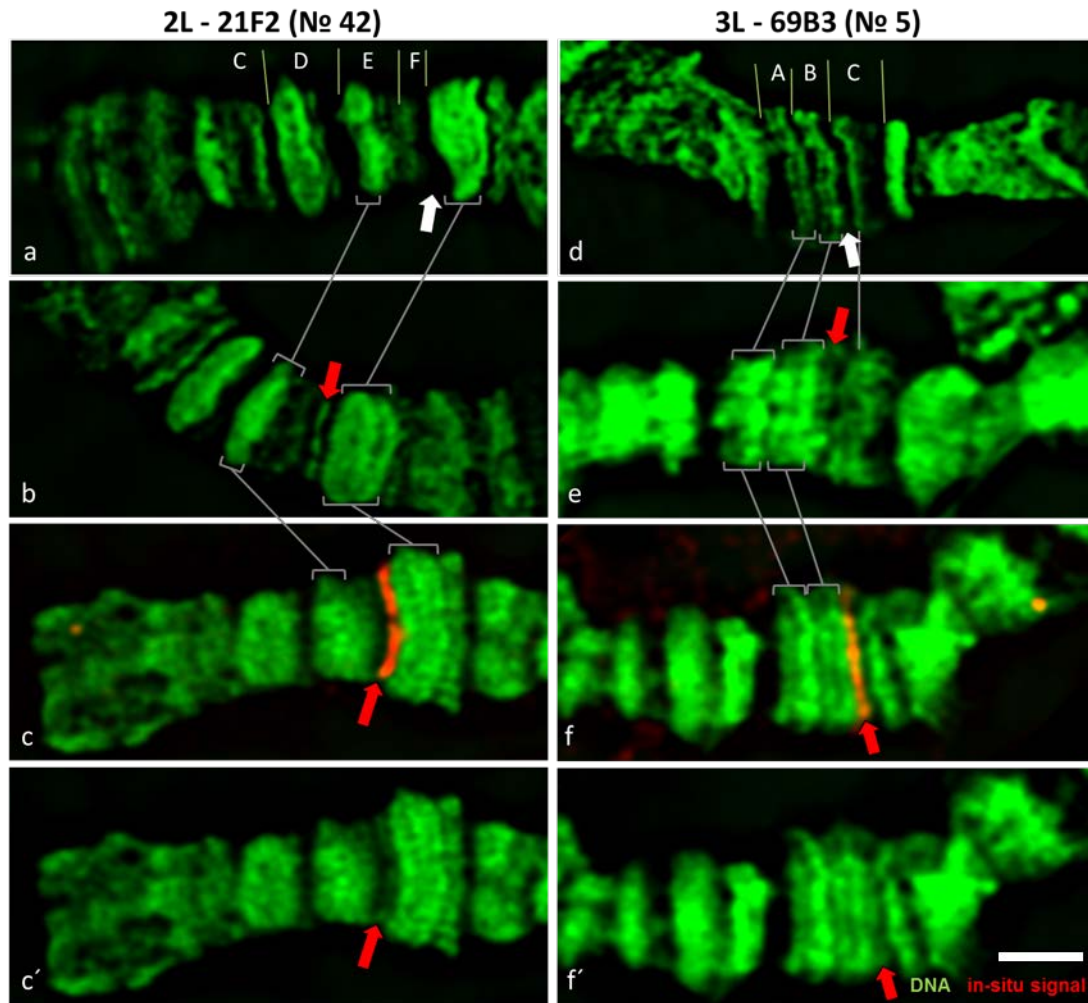


Abb. 6: Erzeugung von ektopischen, kondensierten Chromatin Domänen durch Insertion des pUAST-NattBw P-Element Vektors. Zytologische Kartierung der ektopischen Bande in der transgenen Linie #42 (a-c') und der Linie #5 (d-f'). a) und d) DNA-Färbung der chromosomalen Region in der  $w^{1118}$  Ausgangslinie in der später die Insertion des P-Element Vektors pUAST-NattBw erfolgt war (21C-F für #42 und 69A-C für #5). Der weiße Pfeil deutet auf den späteren Insertionsort (21F3-22A1-2 für #42 und 69B3-C1 für #5). b) und e) DNA-Färbung der Region der P-Element Insertion in den transgenen Linien #42 und #5. Der rote Pfeil markiert die neu entstandene Bandendomäne. c-c') und f-f') Fluoreszenz in-situ Hybridisierung für die Linien #42 und #5 unter Verwendung einer Biotin markierten pUAST-NattBw DNA-Probe. Das in-situ Signal (roter Pfeil) deckt sich mit den ektopischen Banden. Balken 2  $\mu$ m.

### 3.2 Gezielte Rekombination attP gekoppelter Interbanden-Sequenzen in die ektopische Bande erzeugt offenes Chromatin

Der nächste Schritt in der Etablierung eines Test-Systems zur Chromatin Strukturanalyse war die gezielte Insertion von Interbandensequenzen in die kondensierte Chromatindomäne mittels des  $\Phi$ C31-Rekombinationssystems. Dabei sollte geklärt werden, ob Interbandensequenzen auch in einem neuen chromosomalen Umfeld der ektopisch erzeugten Bande offenes Chromatin bilden können. Als zu untersuchende Sequenzen wählte ich die 61C7/8 sowie die 3C6/7 Interbande. Die 61C7/8 Interbande wurde ursprünglich von Semeshin et al. 2008 als 4,7 kb großes DNA-Fragment isoliert und von unserer Gruppe mittels hochauflösender in situ Hybridisierung mit DNA-Proben entlang der Region kartiert (Prof. Saumweber, nicht publiziert). Aus den bisherigen Ergebnissen des „in-situ walk“ ergab sich eine Gesamtlänge der 61C7/8 Interbande von mindestens 17 kb. Diese Kartierung erweitert die 61C7/8 Interbande gegenüber der von Semeshin isolierten 4,7 kb Sequenz um ~12,3 kb in proximale Richtung, wohingegen die distale 61C7/8 Grenze übereinstimmend identifiziert wurde. Zur Überprüfung habe ich eine FISH unter Verwendung einer 4 kb DNA Sonde durchgeführt, die spezifisch an das proximale Ende der ~17 kb 61C7/8 Interbande hybridisiert. In Abb. 9 c-c' ist zu erkennen, dass die Probe eindeutig an die 61C7/8 Interbande bindet. Damit konnte gezeigt werden, dass die 61C7/8 Interbande demnach deutlich größer ist als ursprünglich von Semeshin et al. angenommen und insgesamt einen Bereich von mindestens 17 kb überspannt. Anhand zugrunde liegender genomweiter Daten von S2 Zellen (modENCODE, flybase) weist die gesamte ~17 kb umfassende 61C7/8 Region ein deutliches Auftreten aktiver Histonmodifikationen auf wie z.B. H3K4Me3 und H3K9Ac auf. Im Gegensatz dazu treten Histonmodifikationen spezifisch für inaktives, kondensiertes Chromatin wie z.B. H3K27me3 nicht auf. Außerdem wurden Bindungsstellen für charakteristische Interbanden-Proteine wie z.B. Chriz oder „boundary“-Element Proteine wie z.B. CP190 oder BEAF nachgewiesen (Abb. 7a und Abb. 12a). Besonders charakteristische Bindungsprofile befinden sich sowohl im distalen als auch im proximalen Bereich der 61C7/8 Domäne, welche im Detail unter 3.3.1 beschrieben werden. Auf Basis der zugrundeliegenden Bindungsprofile wurde für die Konstruktion des Interbandenvektors pattP61Cdp sowohl das ~4 kb große distale Ende als auch das ~5 kb große proximale Ende der ~17 kb 61C7/8 Interbande kloniert (Abb. 7).

Die molekularen Grenzen der 3C6/7 Interbande wurden mit Hilfe zytogenetischer Analysen von Rykowski et al. auf ~3 kb eingegrenzt. Auf Basis dieser Kartierung wurde die Sequenz der 3C6/7 Interbande für die Konstruktion des pattP3C Vektors ausgewählt (Abb. 7b). Ähnlich wie bei der 61C7/8 Interbande wurden auch innerhalb der 3C6/7 Sequenz Histonmodifikationen für aktives Chromatin in S2-Zellen identifiziert (H3K4Me3 und H3K9Ac), sowie Bindungsstellen für charakteristische Interbanden-Proteine wie z.B. Chriz oder „boundary“-Element Proteine wie z.B. CP190 oder CTCF lokalisiert. Insbesondere im distalen Bereich der 3C6/7 Domäne, welche mit dem von Keppy und Welshons (1977) identifizierten fa(sw) Fragment übereinstimmt, treten diese Proteine bzw. Histonmodifikationen deutlich auf (Abb. 12b). Dies wird im Detail unter 3.3.1 erläutert. Sowohl der pattP61Cdp als auch der pattP3C Vektor wurden anschließend mit Hilfe des ΦC31-Systems in die attB Kasette innerhalb der ektopisch erzeugten Bandendomäne von Linie #42 rekombiniert (Anhang Tabelle 1).

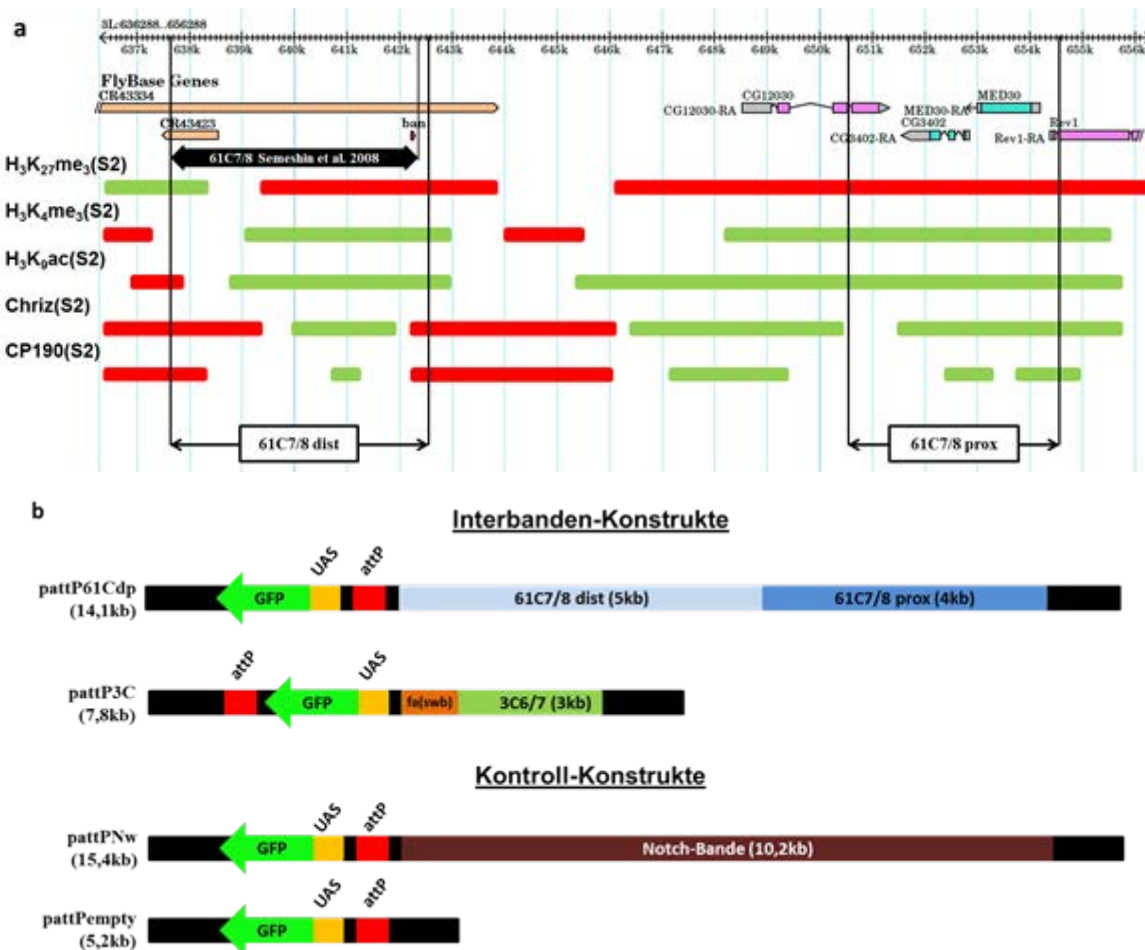


Abb. 7: Konstruktion von 61C7/8- bzw. 3C6/7-Interbandenvektoren auf Basis epigenetischer Profile von Histonmodifikationen und Proteinbindungen innerhalb dieser Sequenzen. a) Molekulare Karte der 61C7/8 Interbanden-Region. Das distale und proximale Fragment, welche für den pattP61Cdp Interbanden-Vektor genutzt wurden, sind markiert. Das 4,7 kb große Interbandenfragment, welches von Semeshin et al. 2008 getestet wurde (schwarzer Doppelpfeil), ist komplett im distalen Fragment der ~17 kb großen 61C7/8 Interbande enthalten. In der Karte sind die in der Region liegenden Gene sowie Histonmodifikationen (H3K27Me3, H3K4Me3, H3K9Ac) und Proteinbindungsstellen (Chriz und CP190) in Bezug zu den genomischen Koordinaten schematisch dargestellt (grüne Balken > +1SD; rote Balken < -1SD; modENCODE: <http://modencode.org>). b) Schematische Darstellung der Interbanden- (pattP61Cdp und pattP3C) sowie der Kontrollkonstrukte (pattPNw und pattPempty), die über gezielte  $\Phi$ C31 vermittelte Rekombination in die Modellbande integriert wurden. Alle Plasmide enthalten ein GFP Reportergen (Hellgrün) unter der Kontrolle eines UAS Promoters (Hellorange) sowie eine attP Rekombinationssequenz (Rot). Das pattP61Cdp Plasmid enthält die in a) hervorgehobenen Fragmente 61Cdist (~5 kb) und 61Cprox (~4 kb) (Hell- und Dunkelblau). Das pattP3C Konstrukt enthält die ~3 kb große 3C6/7 Interbandensequenz (Grün) mit der markierten fa(swb) Region (Orange). In dem pattPNw Kontrollkonstrukt befindet sich eine ~10 kb große Notch-Bandensequenz (Braun). Der pattPempty Vektor ist eine Kontrolle für eventuelle Effekte der Vektorsequenz bzw. der inaktiven UAS/GFP-Sequenz.

### 3.2.1 DNA-Sequenzen lassen sich mit dem $\Phi$ C31-Rekombinations-system ortsspezifisch in die Zielregion integrieren

Die 61C- bzw. 3C-Rekombinanten wurden mittels Sequenzierung und diagnostischer PCR auf vollständige Insertion des Interbandenkonstrukts getestet. Dabei konnte bestätigt werden, dass die zu rekombinierende DNA-Sequenz (pattP61Cdp und pattP3C) vollständig und in der zu erwartenden Orientierung in die attB-Rekombinationssequenz der ektopischen Bande inseriert wurde. Für die diagnostische PCR wurden sowohl Fragmente zur angrenzenden Bandensequenz als auch interne Sequenzen der rekombinierten DNA amplifiziert. Als Kontrolle diente die Linie

#42, bei der die Primer proximal und distal der attB-Sequenz innerhalb der angrenzenden Bandensequenzen lokalisiert waren.

### 3.2.2 Integration von Interbanden-DNA öffnet die kondensierte Chromatindomäne

Die Insertion der 61C7/8 Interbandensequenzen führte zu einer Aufspaltung der ektopischen Bande infolge der Bildung von dekondensiertem Chromatin. Die FISH mit der 61C7/8 Probe überlappte mit dem dekondensierten Bereich, was zeigt, dass die rekombinierte DNA für die Bildung der neu erzeugten, ektopischen Interbande verantwortlich ist (Abb. 8c-d'). Dies bedeutet, dass die integrierte 61C7/8 Sequenz ihren dekondensierten Chromatinstatus auch an einer ektopischen Position im Genom autonom ausbilden und beibehalten kann. Außerdem behält auch die gesplittete Bandendomäne weiterhin die Fähigkeit ihr nun separiertes proximales und distales Fragment als kondensiertes Chromatin aufrechtzuerhalten.

In gleicher Weise wurde die ~3 kb 3C6/7 Notch-Interbande über das  $\Phi$ C31-System in die attB Kasette der Linie #42 rekombiniert. Auch bei diesem Versuch wurde die

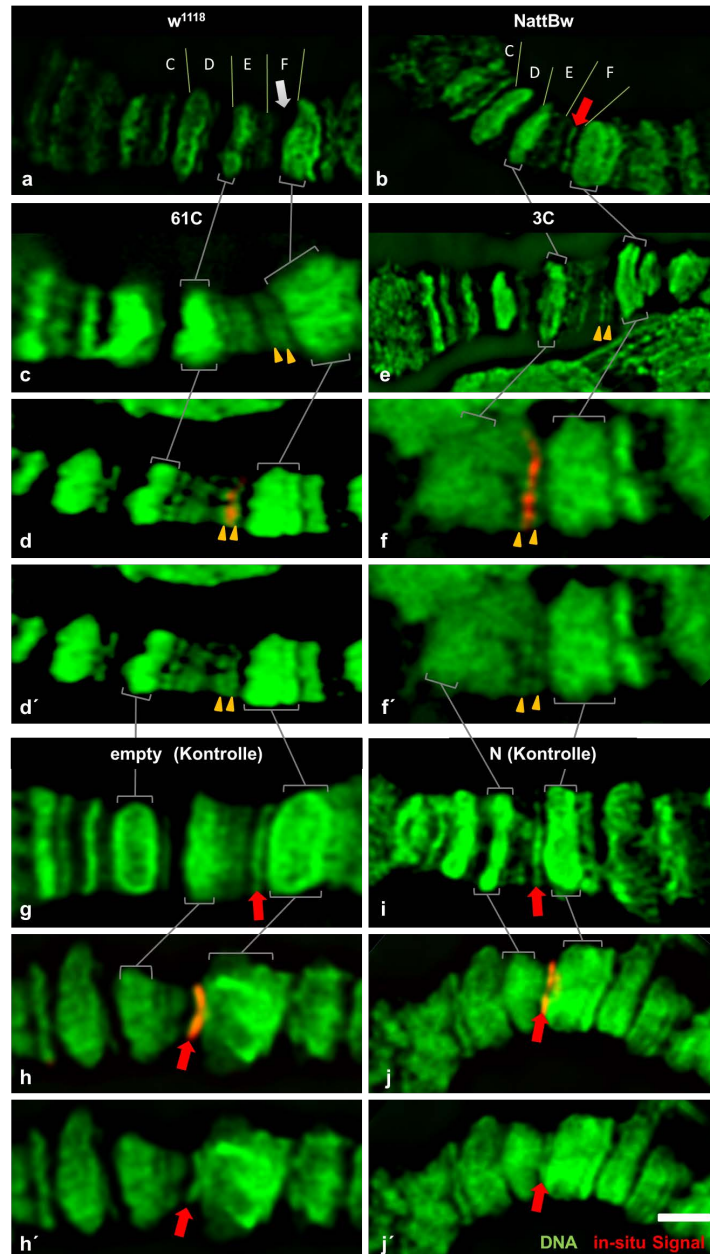


Abb. 8: Rekombination von 61C7/8 bzw. 3C6/7 Interbandensequenzen in die kondensierte Modelldomäne resultieren in der Bildung von dekondensiertem Chromatin. DNA Färbung der chromosomalen Region 21C-F für die  $w^{1118}$  Kontrolllinie (a) und die #42 Kontrolllinie (b). Im Gegensatz zu der Ausgangslinie  $w^{1118}$  enthält die Linie #42 am Insertionsort eine klar definierte zusätzliche Bande (siehe Abb. 6a,b). c-f') Gezielte  $\Phi$ C31 vermittelte Rekombination von Interbandensequenzen resultiert in der Aufspaltung der kondensierten Modellbande infolge der autonomen Bildung einer dekondensierten Interbandenstruktur. c-d') Rekombination der 61C7/8 Interbanden-DNA (pattP61Cdp) sowie e-f') der 3C6/7 Interbanden-DNA (pattP3C). Die gelben Pfeile markieren die zwei Partitionen der gesplitteten Bande. c und d) DNA-Färbung; d-d' und f-f') In situ Hybridisierung unter Verwendung des jeweiligen Interbanden-



*Plasmids (pattP61Cdp bzw. pattP3C). Man beachte, dass das Signal mit der dekon-*  
*densierten Interbandendomäne innerhalb der gesplitteten Bande übereinstimmt. Die*  
*gleiche Anordnung ist für die Kontrollkonstrukte (g-h') pattPempty sowie (i-j') pattPN*  
*verwendet worden. Bei keinem der beiden Kontrollen ist eine Aufspaltung der Mo-*  
*dellbande und demnach auch keine Bildung dekondensierten Chromatins festzustel-*  
*len (roter Pfeil). Das Signal der in situ Hybridisierung unter Verwendung der Plasmide*  
*pattPempty sowie pattPN überlappt vollständig mit der diskreten ektopischen Ban-*  
*dendomäne. Balken 2  $\mu$ m.*

Modell-Bande infolge der autonomen Bildung einer dekondensierten Chromatin-Domäne gesplittet. Dies konnte abermals mittels FISH unter Nutzung der 3C6/7 Probe untermauert werden, welche eine klare Signalüberlappung mit der neu generierten dekondensierten Chromatin-Struktur aufwies (Abb. 8e-f'). Um einen Beitrag der Vektor- bzw. Reportergensequenz zur lokalen Chromatindekondensation auszuschließen, wurde ein Kontrollkonstrukt bestehend aus dem pTAattP Vektor und einer UAS/GFP-Reportergensequenz in die Linie #42 rekombiniert (Anhang Tabelle 1). Die Rekombinanten wiesen keinerlei Aufspaltung der artifiziellen Bande auf und demnach konnte ein Einfluss dieser Sequenzen auf eine Bildung offenen Chromatins ausgeschlossen werden (Abb. 8g-h'). Die Insertion von ~10 kb Notch Bandensequenz in den Stamm #42 resultierte erwartungsgemäß ebenfalls in keiner Aufspaltung der kondensierten Modell-Domäne (Abb. 8i-j', Anhang Tabelle 1). Dies unterstützt die Annahme, dass der kondensierte Chromatin-Status von transkriptionell inaktiven Sequenzen auch in ektopischen Positionen beibehalten wird.

### 3.2.3 Die Chromatinstruktur der ektopischen Interbandenregion ist ähnlich der Struktur am endogenen Lokus

Der jeweilige Grad der DNA-Kondensierung wird lokal durch Proteinbindung und epigenetischen Modifikationen definiert. Die Regulation der DNA-Kondensation bestimmt gleichzeitig auch die funktionellen Eigenschaften des regulierten Chromatins. Zur Realisierung dynamischer zellulärer Prozesse (z.B. Replikation, Transkription, DNA-Reparatur) ist eine lokale Dekondensation von Chromatin erforderlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Histon-Kinase Jil-1 durch Phosphorylierung von H3S10



zur lokalen Dekondensation von Chromatin beiträgt (Deng et al., 2008) und dass der Chriz-Komplex an der DNA-Rekrutierung von Jil-1 beteiligt ist (Gan et al., 2011). Beide Proteine konnte ich an der endogenen 61C7/8 Interbande immunzytologisch identifizieren (Abb. 9a-b''). Die Frage war nun, ob auch die artifiziell erzeugte 61C7/8 Interbande diese charakteristischen Proteinbindungen aufweist und somit nicht nur den strukturellen Charakter, sondern auch den molekularen Charakter der endogenen Sequenz imitiert. Dazu habe ich bei den rekombinanten Linien immunzytologische Analysen mit Chriz und Jil-1 Antikörpern durchgeführt. In der w<sup>1118</sup> Kontrolllinie konnte ich in der Region 21F3-22A1 ein starkes Signal für Chriz identifizieren, welches bei der Linie #42 durch die Insertion des Banden-Konstruktes (pUAST-NattBw) in zwei Signale gespalten wird (Abb. 9d-e''). Eine stärkeres distales und ein schwächeres proximales Chriz-Signal flankieren dabei die ektopisch erzeugte kondensierte Chromatindomäne, die selbst keinerlei Chriz-Bindung aufweist. Infolge der Integration des Interbanden-Konstruktes (pattP61C), bildete sich eine zusätzliche Bindungsstelle für Chriz innerhalb der gesplitteten Bande. Dieses Signal korreliert mit der ektopisch erzeugten 61C7/8 Interbande und ist von ähnlicher Intensität wie am endogenen Locus (Abb. 9f-f''). Die Ergebnisse der immunzytologischen Analyse der Jil1 Bindung waren sehr ähnlich. Auch hier wurde in der Region 21F3-22A1 ein starkes Jil1 Bindungssignal in der w<sup>1118</sup> Kontrolle nachgewiesen, welches nach Etablierung der Modellbande (pUASTNattBw) in zwei Signale aufsplittete (Abb. 9g-h''). Nach Rekombination der 61C7/8 Interbandensequenz entstand eine zusätzliche Bindungsstelle innerhalb der gesplitteten Bande (Abb. 9i-i''). Für die Proteine BEAF32 und CP190 konnte ebenfalls eine Bindung sowohl in der endogenen als auch in der artifiziell erzeugten 61C7/8 Interbande detektiert werden (ohne Abbildung). Die immunzytologische Analyse lässt somit darauf schließen, dass die ektopisch erzeugten dekondensierten Chromatindomänen nicht nur die Zytologie, sondern auch die lokale Proteinbindung und somit die funktionellen Eigenschaften des endogenen Locus nachbilden. Im Gegensatz zur 61C7/8 Interbande, wurde die 3C6/7 Interbande bereits hinsichtlich ihrer Zytologie, ihres molekularen Charakters und ihrer essentiellen Sequenzen in der Literatur weitgehend beschrieben. So konnte ursprünglich von Keppy und Welshons (1977) und nachfolgend auch von anderen Gruppen (Vazquez und Schedl, 2000; Semeshin et al., 2008) bereits gezeigt werden, dass das ~880 bp fa(swb) Fragment essentiell für die Bildung und Aufrechterhaltung der 3C6/7 Interbande ist. Dieses Ergebnis konnte von mir in Punkt 3.3.1 bestätigt werden. Auch die molekula-

ren Grenzen der 3C6/7 Interbande konnten z.B. von Rykowski et al., 1988 und Zimin et al., 2004 mittels P-Element Insertion, hochauflösender FISH bzw. Elektronenmikroskopie und computergestützten Berechnungen molekularer Distanzen (Distanz zwischen Referenzdomäne und FISH-Signal) kartiert werden. Aus diesem Grund lag für die weiterführenden Analysen die Priorität auf der 61C7/8 Interbande und es wurden keine immunzytologischen Studien bzw. Expressionsanalysen für die pattP3C Rekombinante durchgeführt.

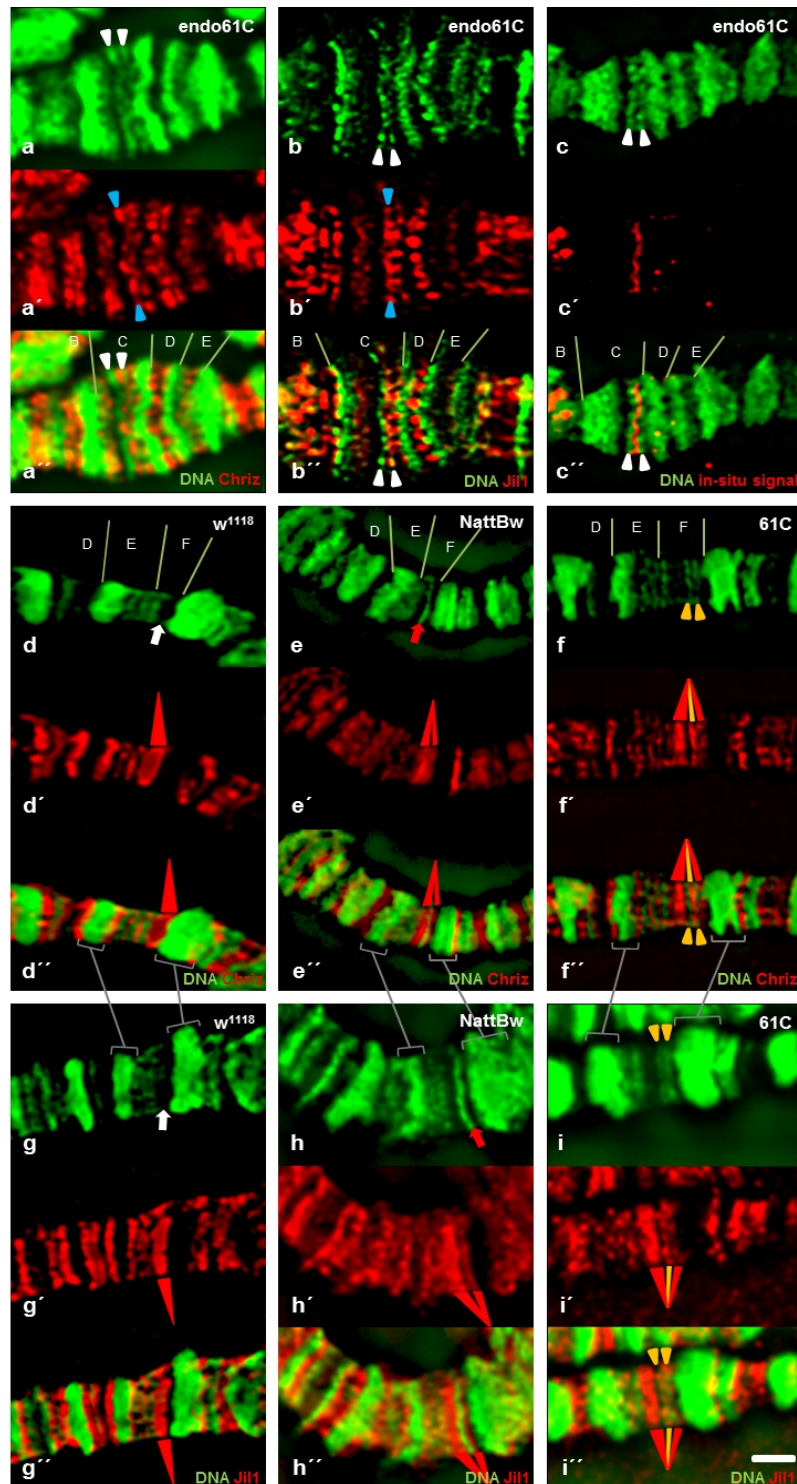


Abb. 9: Die Chromatinstruktur der ektopischen Interbande ähnelt der am endogenen Locus. a-b'' und d-i'') Der endogene 61C7/8 Locus als auch die transgene 61C7/8 Sequenz innerhalb der 21F Region wurde immunzytologisch auf Chriz und Jil-1 Proteinbindung untersucht. Die endogene 61C7/8 Interbande zeigt ein klares Signal für Chriz (blaue Pfeile, a-a'') und Jil-1 (blaue Pfeile, b-b''). Die weißen Pfeile markieren die 61C7 bzw. 61C8 Banden. c-c'') In-situ Hybridisierung in der endogenen 61C Region unter Verwendung einer Biotin markierten DNA-Sonde, die spezifisch am proximalen Fragment hybridisiert (Probe pattP61Cprox). Man beachte, dass das Signal komplett in der Interbandendomäne lokalisiert ist. Immunfärbung der 21F Insertions-Region für Chriz (d-f'') und für Jil1 (g-i''). d-d'') In der 21F Region (weißer Pfeil) der *w<sup>1118</sup>* Kontrolllinie ist ein starkes Chriz Signal (d-d'' roter Keil) und Jil1 Signal (g-g'' roter Keil) auszumachen. Nach Etablierung der ektopischen Bande (roter Pfeil) infolge der pUASTNattBw Insertion wird dieses Chriz- (e-e'') bzw. Jil1-Signal (h-h'') in zwei Partitionen aufgesplittet (roter Doppelkeil). Die Erzeugung der dekondensierten Chromatinstruktur innerhalb der Modellbande führt für Chriz (f-f'') als auch für Jil1 (i-i'') zu einer neuen Bindungsstelle (gelber Keil) innerhalb der gesplitteten Bande (gelbe Pfeile). Balken 2  $\mu$ m.

### 3.2.4 Die bei der Rekombination genutzten Reportergene tragen nur nach Induktion zur dekondensierten Chromatinstruktur bei

Der pattP61C Vektor, welcher für die Rekombination mit der attB-Rekombinationssequenz innerhalb der Modell-Bande genutzt wurde, trägt ein GFP Reportergen unter Kontrolle eines GAL4 induzierbaren UAS Promoters. Eine speicheldrüsenspezifische Aktivierung der GFP-Expression führt zu einer lokalen Auflockerung des Chromatins und dadurch zu einer sogenannten „Puff“ Bildung. Der Grad der „Puff“ Bildung ist abhängig von der Stärke der Induktion (Abb. 10 a-b') und kann auch regional innerhalb einer Speicheldrüse differieren (Rasch et al., 1970). Eine ähnliche lokal induzierbare Dekondensation des Chromatins ist auch bei Rekombinanten festzustellen, welche lediglich die Vektor-Sequenz (pattPempty), die zusätzliche Notch-Bandensequenz (pattPNw) oder die 3C6/7 Interbandensequenz (pattP3C) tragen (Abb. 10 c-e'). In diesem Fall beruht also die lokale Dekondensierung auf der Reportergenaktivierung und nicht auf einer Beeinflussung durch das

jeweilig umgebende Chromatin. Ohne Induktion des GFP Reportergens ist dagegen eine lokale Dekondensation in Form einer Interbandenbildung nur bei den pattP61C bzw. pattP3C Rekombinanten zu erkennen. Daraus schlieÙe ich, dass in diesem Fall die Chromatindekondensation auf der Insertion der Interbandensequenzen beruht und nicht auf der Transkription des GFP Reportergens. Dies wurde durch eine quantitative Transkriptionsanalyse des GFP Gens mittels qRT-PCR aus Speicheldrüsen-RNA bestätigt. Bei der GAL4 aktivierten Linie #42, welche die pattP61C Insertion trägt, ist eine starke GFP Expression messbar, wohingegen ohne GAL4 Aktivierung sich die GFP Expression nicht signifikant von der  $w^{1118}$  Negativkontrolle unterscheidet (Abb. 10 f).

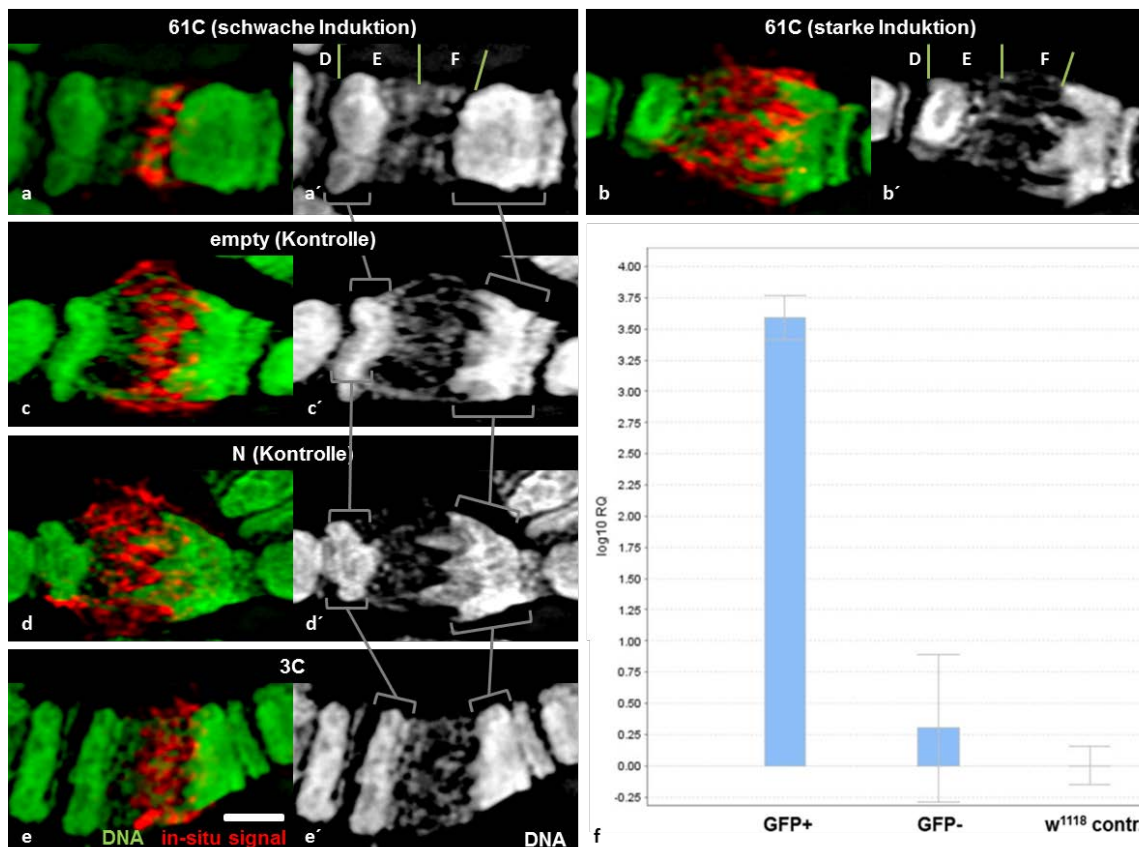


Abb. 10: Die Aktivierung des UAS/GFP Reportergens induziert sowohl die Transkription als auch die chromosomale Dekondensation am Insertionsort. a-b') Das UAS/GFP Reportergen in pattP61Cdp transgenen Fliegen wurde mit einem speicheldrüsenspezifischen Treiber (G61-GAL4) in unterschiedlicher Stärke aktiviert und mittels in situ Hybridisierung unter Verwendung einer pattP61Cdp Sonde getestet. a und a') Schwache Induktion führt zu geringer chromosomaler Auflockerung. b und b') Starke Induktion führt zu Puff-Bildung. c-e') Eine ähnliche Auflockerung bis hin zur

*Puff-Bildung ist auch bei den Kontrolllinien ( pattPempty und pattPN) sowie der 3C Linie zu erkennen (Probe bei der in situ Hybridisierung war das entsprechende Plasmid). Balken 2 µm. f) Die Transkription des UAS/GFP Reportergens in +/- GAL4 induzierten pattP61Cdp Linien sowie in der w<sup>1118</sup> Kontrolllinie wurde quantitativ mittels qRT-PCR getestet.*

### 3.3 Identifizierung essentieller Sequenzen zur Bildung und Aufrechterhaltung dekon- densierten Chromatins

Um die relevanten DNA-Sequenzen aufzudecken, die für die autonome Bildung und Aufrechterhaltung der 61C7/8 bzw. 3C6/7 Domänen notwendig sind wurden zunächst partielle Deletionen der bislang verwendeten Interbandensequenzen vorgenommen (Abb. 11). Nach gezielter Insertion dieser Deletionskonstrukte (Anhang Tabelle 1) wurden die Rekombinanten zytologisch auf die Bildung dekondensierten Chromatins innerhalb der ektopischen Bande untersucht. Ist die modifizierte Interbandensequenz nicht mehr in der Lage dekondensiertes Chromatin zu bilden, dann muss die deletierte DNA Sequenzen enthalten, die für die Bildung von Interbanden essentiell sind.

#### 3.3.1 Deletion essentieller Sequenzabschnitte von 61C7/8 und 3C6/7 führt zum Ver- lust der Fähigkeit offenes Chromatin zu bilden

Die Festlegung der zu deletierenden Fragmente innerhalb der 61C7/8 bzw. 3C6/7 Sequenzen wurde auf Basis der für diese Regionen spezifischen Proteinbindungsstellen in S2 Zellen vorgenommen. Dazu wurden Daten aus genomweiten Bindungsstudien genutzt, die in der modENCODE Datenbank zur Verfügung standen. Bei allen Deletionskonstrukten wurden potentiell relevante Proteinbindungsstellen entfernt. Die Betrachtung der Daten ergab, dass sowohl im proximalen als auch im distalen Fragment der 61C7/8 Sequenz prominente Bindungsstellen für das interbandenspezifische Protein Chriz und die Boundary-Proteine BEAF32 und CP190 auftreten (Abb. 12a). Um zu klären, ob die beiden an der Grenze zur 61C7/8 Interbande liegenden Fragmente zur Bildung und Aufrechterhaltung der dekondensierten Chromatinstruktur beitragen, wurde eine Deletion im distalen als auch im proximalen Bereich der Sequenz unabhängig voneinander vorgenommen. Bei der distalen Deletion wurde ein

~2,7 kb Fragment und bei der proximalen Deletion ein ~2,3 kb Fragment entfernt (Abb. 11 und 12a rot unterlegt).

Für die 3C6/7 Interbande ergab das Protein-Bindungsprofil eine Bindung für Chriz und die boundary Proteine CTCF und CP190 im distalen Bereich, nahe der TSS des Notch Gens (Abb. 12b). Dieser Bereich entspricht in etwa dem Sequenzabschnitt, der in der fa(swb) Mutante deletiert ist. Die 3C6/7 DNA-Sequenz mit der darin befindlichen ~840 bp große Deletion im distalen Bereich wurde durch PCR-Amplifizierung aus genomischer DNA der fa(swb) Mutante gewonnen (Abb. 11 und 12b rot unterlegt). Die etablierten Deletionskonstrukte wurden mittels PhiC31-Rekombination in das *Drosophila* Genom integriert.

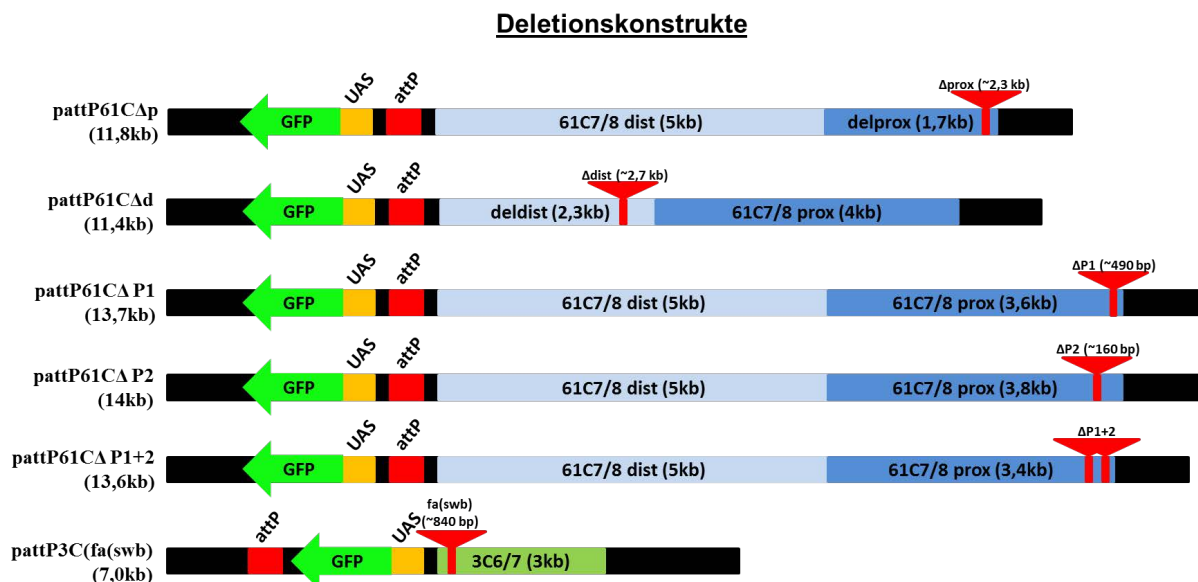


Abb. 11: Schematische Darstellung der 61C7/8 und 3C6/7 Deletionskonstrukte. Die Auswahl der proximalen als auch der distalen Deletion für die 61C7/8 Interbande basierte auf molekulare Daten für Proteinbindungen und Histonmodifikationen in S2 Zellen (modENCODE, Abb. 8). Für pattP61CΔp wurde eine ~2,3 kb Sequenz am proximalen Ende des proximalen Fragments deletiert. Bei pattPΔd wurde eine ~2,7 kb Sequenz am proximalen Ende des distalen Fragments deletiert. Für die Deletion potentieller Promoterelemente wurde zusätzlich der Promoter Prediction Server 2.0 genutzt. Die Promoterdeletionen pattPΔP1, pattPΔP2 und pattPΔP1+2 sind am proximalen Ende des proximalen Fragments zwischen den von ihnen regulierten Genen lokalisiert (siehe Abb. 14). Für pattPfa(swb) wurde die 3C6/7 Sequenz verwendet, welche die ~840 bp große fa(swb) Deletion aufwies.



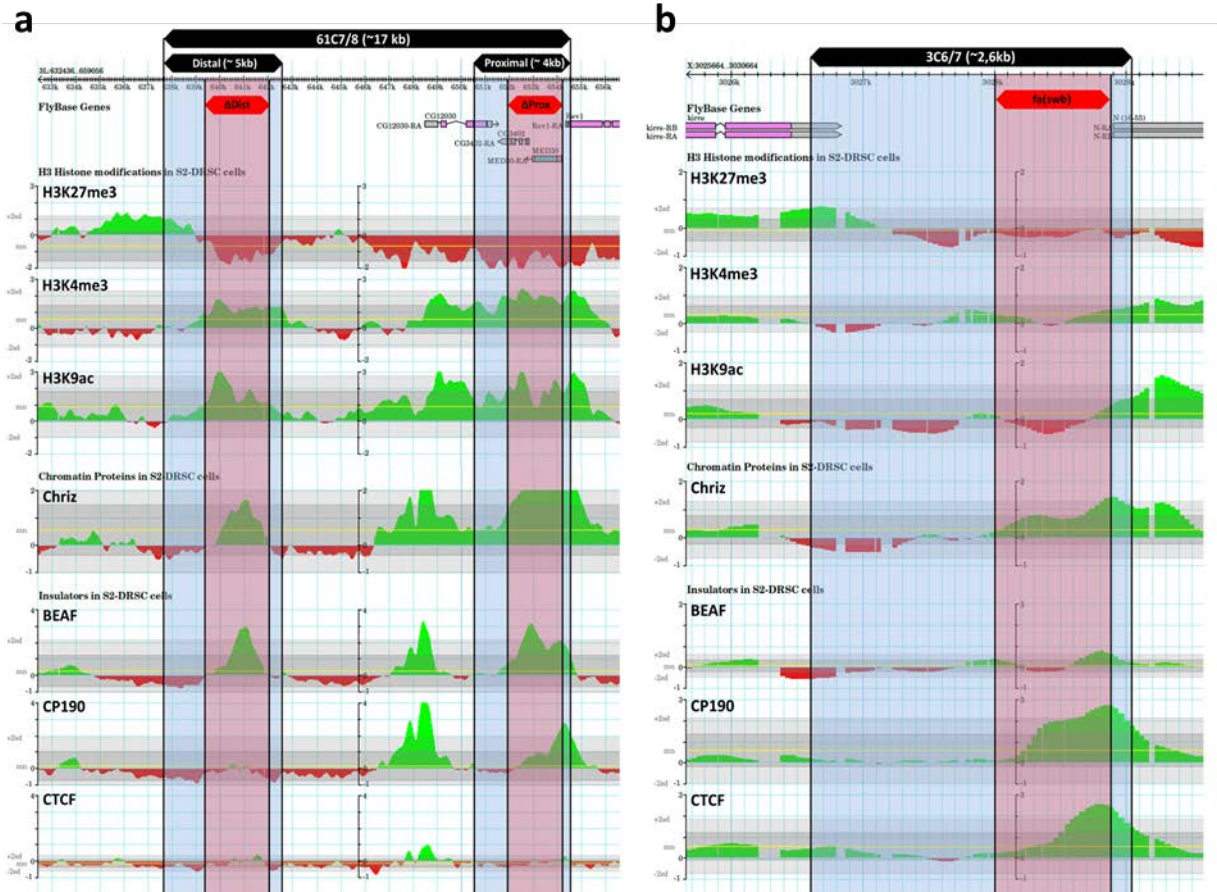


Abb. 12: Chromatinstruktur deletierter Bereiche der Interbandenregionen 61C7/8 und 3C6/7. Genkarte, molekulare Protein-Bindungsprofile sowie spezielle Histonmodifikationen innerhalb der 61C7/8 Region (a) und der 3C6/7 Region (b). a) Für den pattP61Cdp Vektor genutzte proximale und distale DNA-Sequenz (schwarze Balken, blaue Fläche) der 61C7/8 Interbande. Deletierte Abschnitte für die Etablierung der pattP61C $\Delta$ d bzw. pattP61C $\Delta$ p Konstrukte sind als rote Balken mit darunter liegender roter Fläche markiert. Molekulare Profile (von oben nach unten): 1. Genkarte, 2. H3K27me3, 3. H3K4me3, 4. H3K9Ac, 5. Chriz, 6. BEAF, 7. CP190, 8. CTCF. b) Für den pattP3C Vektor genutzte DNA-Sequenz der 3C6/7 Region (schwarzer Balken, blaue Fläche). Der deletierte Abschnitt für die Etablierung des pattP3C(fa<sup>swb</sup>) Konstrukts ist als roter Balken mit darunter liegender roter Fläche markiert. Molekulare Profile (von oben nach unten): 1. Genkarte, 2. H3K27me3, 3. H3K4me3, 4. H3K9Ac, 5. Chriz, 6. BEAF, 7. CP190, 8. CTCF.

Die Rekombinanten wurden zytologisch auf Insertion der deletierten Interbandensequenzen mittels FISH getestet. Die in-situ Signale lagen bei allen rekombinanten Linien im erwarteten Locus innerhalb der ektopischen Modellbande in Übereinstimmung der Daten der genomischen Kartierung mittels diagnostischer PCR.

Die zytologische Analyse ergab bei der distalen 61C7/8 Deletion keine Veränderung in der Fähigkeit eine dekondensierte Chromatinstruktur zu bilden (Abb. 13a-a'). Die Deletion im proximalen Bereich eliminierte dagegen die Fähigkeit des Restfragments zur Bildung dekondensierten Chromatins. Dies ist sowohl bei der FISH als auch bei den DNA gefärbten polytären Chromosomen deutlich zu erkennen (Abb. 13b-b'). Obwohl beide Fragmente Teil der 61C7/8 Interbande sind und charakteristische Interbandenproteine binden, ist nur ein Bereich des proximalen Abschnitts essentiell für die Bildung und Aufrechterhaltung von dekondensiertem Chromatin. Falls die Proteine Chriz, Jil1 und CP190 eine Rolle bei der Bildung der 61C7/8 Domäne spielen, dann ist deren Bindung lediglich im proximalen Teil von Bedeutung.

Im Fall der 3C6/7 Interbande bewirkte die Deletion der ~700bp großen fa(swb) Region, dass die restliche DNA-Sequenz nicht mehr in der Lage ist dekondensiertes Chromatin zu bilden. Die ektopische Bandendomäne blieb nach der Rekombination des verkürzten 3C6/7 Fragments kompakt (Abb. 13a-b'). Dies konnte bereits durch andere Gruppen (Semeshin et al., 2008) gezeigt werden und bestätigt damit den für die Bildung offenen Chromatins essentiellen Charakter der fa(swb) Region. In dieser Region sind regulatorische Komponenten für das angrenzende Notch Gen lokalisiert.

### 3.3.2 Die Fähigkeit zur Bildung dekondensierten Chromatins geht einher mit der Bindung spezifischer Proteine

Die zytologische Analyse ergab, dass im Falle der 61C7/8 Sequenz der proximale Bereich essentiell für die Bildung von dekondensiertem Chromatin ist. Eine 2,3 kb Deletion im proximalen DNA-Fragment bewirkt, dass die verbleibende Interbandensequenz nicht mehr in der Lage ist ektopisch dekondensiertes Chromatin zu bilden.



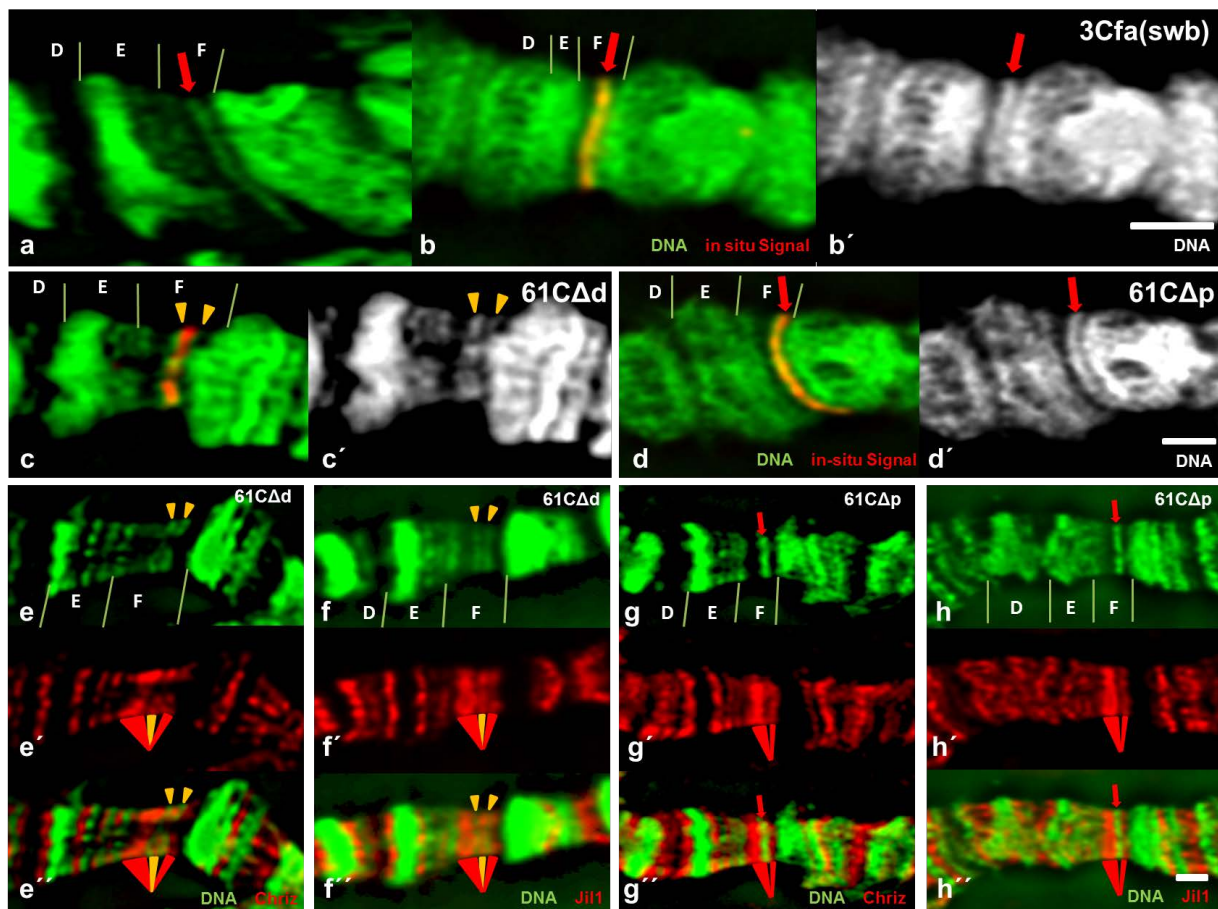


Abb. 13: Die Chromatinstruktur der Deletionsvarianten 3Cfa(swab), 61C $\Delta$ distal und 61C $\Delta$ proximal. Nachweis der Rekombination mittels DNA-Färbung (a) und FISH (b-b') bei pattP3C(fa(swab)) Rekombinanten sowie mittels FISH (c-d') bei pattP61C $\Delta$ d und pattP61C $\Delta$ p Rekombinanten. a-b') Die fa(swab) Deletion bewirkt den Verlust der Fähigkeit der 3C6/7 Interbandensequenz dekondensiertes Chromatin zu bilden (roter Pfeil in a-b'). c-c') Das lokal deletierte distale Fragment verfügt unverändert über die Kapazität dekondensiertes Chromatin zu bilden, erkennbar an der gesplitteten Bande (gelbe Pfeile) mit der darin befindlichen in situ markierten Interbande. d-d') Im Gegensatz dazu ändert sich die Zytologie der Modellbande im Falle der proximalen Deletion nicht. Die proximal um 2,3 kb deletierte 61C-Interbandensequenz ist nicht mehr in der Lage dekondensiertes Chromatin zu bilden (roter Pfeil und in situ Signal). Als jeweilige DNA Probe wurde das entsprechende Deletionskonstrukt genutzt. e-e'' und f-f'') Die unverändert stabile Bildung einer Interbande im Falle der distalen Deletion geht einher mit einer stabilen Bindung von Chriz und Jil-1 (gelber Keil in e-f'') innerhalb der ektopischen Interbande. g-g'' und h-h'') Der Verlust der dekondensierten

*Chromatinstruktur (roter Pfeil) bei der lokalen proximalen Deletion, zieht einen Verlust der Bindungen von Chriz und Jil1 nach sich (g-h''). Balken 2  $\mu$ m.*

Der funktionelle Charakter dekondensierter Interbandendomänen ist definiert durch die spezifische Bindung unterschiedlicher Proteine und die Anwesenheit bestimmter epigenetischer Modifikationen. Um die Frage zu klären, ob sich mit dem Verlust der zytologischen Struktur auch die funktionellen Eigenschaften verändern, wurden immunzytologische Analysen durchgeführt. Dabei habe ich wie auch in 3.2.3 die Bindung der Proteine Chriz, Jil, CTCF, CP190 und BEAF32 untersucht. Die Immunzytologische Analyse ergab, dass bei 61C $\Delta$ prox-Rekombinanten mit dem Verlust der dekondensierten Chromatinstruktur auch die Bindung der Interbandenproteine entfällt. In Abb. 13e-e'' ist dies für das Protein Chriz und in Abb. 13f-f'' für das Protein Jil1 dargestellt. Im Gegensatz dazu ist bei den 61C $\Delta$ dist-Rekombinanten neben der unveränderten zytologischen Chromatinstruktur auch das Proteinbindungsverhalten unverändert. Alle untersuchten Proteine (Chriz, Jil1, CTCF, CP190 und BEAF32) konnten wie bei der endogenen Sequenz bzw. bei den 61C-Rekombinanten auch bei der 61C $\Delta$ dist-Rekombinanten innerhalb der ektopischen Interbande nachgewiesen werden. In Abb. 13 c-d'' ist diese Beobachtung für das Protein Chriz bzw. Jil1 dargestellt.

### 3.3.3 Ein 490 bp Element mit Promoterfunktion in der proximalen Region der 61C7/8 Interbande ist essentiell für die Bildung von dekondensiertem Chromatin

Trotz starker Bindungsstellen für die Proteine Chriz, BEAF und CP190 an beiden Flanken der 61C7/8 Interbande führt lediglich die 2,3 kb Deletion innerhalb der proximalen Sequenz zum Verlust der Fähigkeit zur Bildung einer dekondensierten Chromatinstruktur verbunden mit dem Verlust der Bindung typischer funktioneller Proteine. Dies wirft die Frage auf, ob die Bindung der untersuchten Proteine überhaupt generell für die 61C7/8 Interbandenbildung notwendig sind oder ob sie ihre Funktion lediglich über Bindungen im proximalen Bereich ausüben. Als Alternative könnten potentielle Promoterelemente der im proximalen Fragment kartierten Gene (CG3402, MED30 und Rev1) für die Bildung der dekondensierten Struktur relevant sein. Alle drei Gene werden nach Daten der FlyBase in Speicheldrüsen von Larven des dritten Stadiums moderat exprimiert. Mit Hilfe der modENCODE Datenbank so-

wie des frei zur Verfügung stehenden „Promoter 2.0 Prediction Server“ konnten im proximalen Fragment zwei Promoterelemente identifiziert werden. Diese liegen zum einen zwischen den Genen Rev1 und MED30 sowie weiter distal zwischen den Genen MED30 und Rev1 (Abb. 14a). Zur Klärung der Frage, ob diese Promoterelemente für die Bildung der 61C7/8 Interbande notwendig sind, wurden Konstrukte herge-

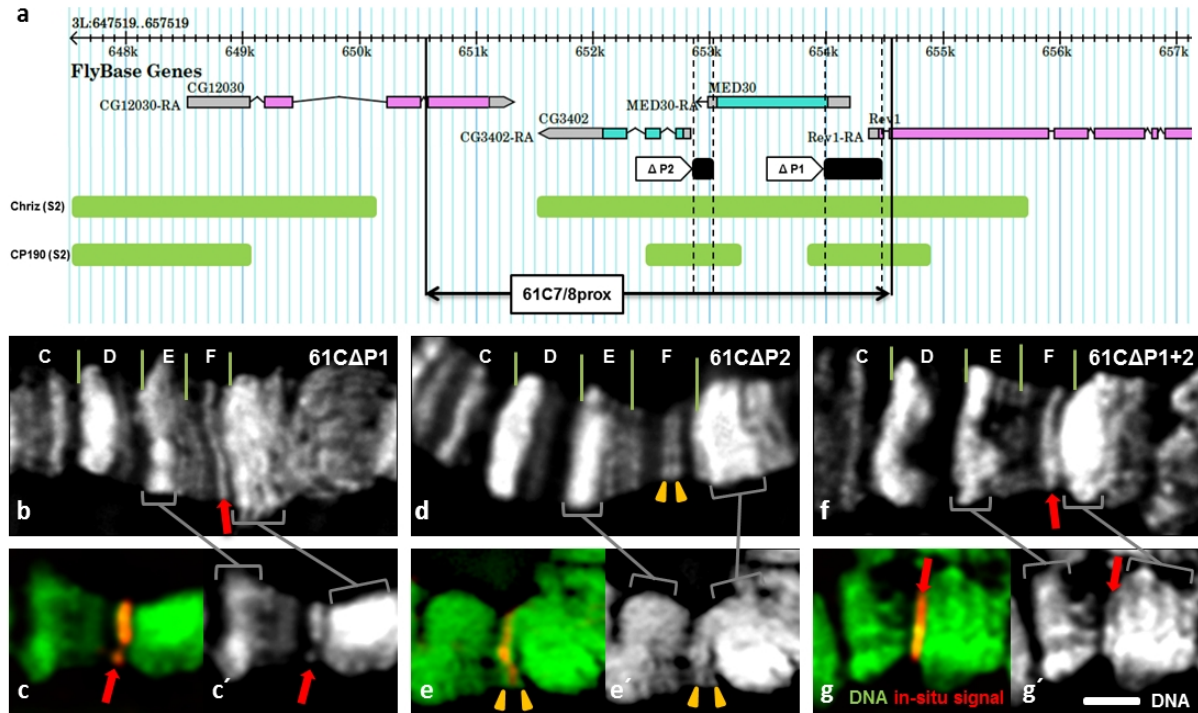


Abb. 14: Die Deletion des Promoter Elements P1 führt zum Verlust der Fähigkeit zur Interbandenbildung. Nach Deletion von Promoterelementen (P1, P2 und P1+2) innerhalb des proximalen 61C7/8 Fragments wurde eine zytologische Analyse der entsprechenden Rekombinanten (*pattP61CΔP1*, *pattP61CΔP2* und *pattP61CΔP1+2*) durchgeführt. a) Molekulare Karte des proximalen 61C7/8 DNA-Fragments mit den darin befindlichen Genen sowie den markierten Promoterdeletionen  $\Delta P1$  und  $\Delta P2$  (schwarze Balken). Alle anderen Markierungen wie bei Abb. 7. b, d, f) DNA-Färbung sowie (c,c' und e,e' und g,g') FISH der polytären Chromsomen von *pattP61CΔP1*, *pattP61CΔP2* und *pattP61CΔP1+2* Rekombinanten. b-c' und f-g') Nach Deletion des Promoter 1 ist die Fähigkeit zur Bildung der dekondensierten Chromatinstruktur verloren gegangen (rote Pfeile). d-e') Bei Rekombinanten mit einer Promoter 2 Deletion ist die 61C7/8 Sequenz weiterhin in der Lage dekondensiertes Chromatin zu bilden und damit die Modellbande zu splitten (gelbe Pfeile). Balken 2  $\mu m$ .

stellt die entweder für je ein (pattP61C $\Delta$ P1 bzw. pattP61C $\Delta$ P2) oder für beide (pattP61C $\Delta$ P1+2) Promotersequenzen deletiert waren (Abb. 11). Diese Deletionskonstrukte wurden wie beschrieben über sequenzspezifische Rekombination in die Modellbande der Linie #42 integriert (Tabelle 5) und anschließend auf ihre Zytologie, ihre Fähigkeit zur Proteinbindung und ihr Expressionsverhalten analysiert.

Die erhaltenen Rekombinanten wurden wie beschrieben auf Insertion der Promoter-Deletionskonstrukte mittels FISH getestet. Die in-situ Signale lagen bei allen drei rekombinanten Linien (pattP $\Delta$ P1, pattP $\Delta$ P 2 und pattP $\Delta$ P 1+2) im erwarteten Locus innerhalb der Modellbande. Die chromosomale Strukturanalyse des Banden/Interbanden-Musters zeigte bei der ~160bp großen Promoter-2 Deletion (pattP $\Delta$ P2) unverändert die Ausbildung einer dekondensierten Chromatinstruktur (Abb. 14 d-e'). Die ~490bp große Deletion des Promoter-1 in den Rekombinanten pattP $\Delta$ P1 und pattP $\Delta$ P1+2 eliminierte dagegen die Fähigkeit der verwendeten Fragmente zur Bildung dekondensierten Chromatins (Abb. 14b-c' und f-g'). Dieses Ergebnis deutet auf eine essentielle Rolle der Promoter-1 Sequenz bei der Bildung und Aufrechterhaltung der 61C7/8 Interbande hin. Mit dem Verlust der P1-Sequenz gehen allerdings nicht nur potentiell relevante Promotersequenzen verloren, sondern es werden gleichzeitig in diesem Fragment lokalisierte spezifische Proteinbindungsstellen für Chriz, CP190 und BEAF32 eliminiert. Neben einem möglichen Effekt einer transkriptionellen Inaktivierung benachbarter Gene (MED30 und Rev1) könnte somit auch eine fehlende Proteinbindung infolge dieser Deletion die Ursache für den Verlust der Fähigkeit dekondensiertes Chromatin auszubilden sein.

#### 3.3.4 Die Promoter 1 Deletion zieht den Verlust der Bindung von Chromationproteinen nach sich

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten, wurden die Promoterdeletionen pattP $\Delta$ P1, pattP $\Delta$ P2 und pattP $\Delta$ P1+2 immunzytologische auf die Bindung von Interbandenproteinen untersucht. Dabei wurde zusätzlich zur Bindung der Interbandenproteine Chriz und Jil1 auch die Bindung der RNA-Pol-II<sub>o</sub>Ser<sub>5</sub> untersucht. Diese RNA-Polymerase stellt die initiiierende, aber nicht aktiv transkribierende Form dar. Bei der pattP61C Kontrolle konnte eine deutliche Bindung der RNA-Polymerase sowohl innerhalb der gesplitteten artifiziellen Bande, als auch in der endogenen 61C7/8 Sequenz detektiert werden (Abb. 15 a-a'' und e-e''). Bei den rekombinanten Linien, bei

denen die Promoter 1 Deletion zur Unterdrückung der Ausbildung einer dekondensierten Chromatinstruktur führte (pattP $\Delta$ P1 und pattP $\Delta$ P1+2), war keinerlei Bindung der untersuchten Proteine vorhanden (hier nur für RNA-Pol-II<sub>o</sub>Ser<sub>5</sub> in Abb. 15 b-b'' und d-d'' gezeigt). Im Gegensatz dazu wies die pattP $\Delta$ P2 Linie eine deutliche Proteinbindung von Chriz, Jil1 und RNA-Pol-II<sub>o</sub>Ser<sub>5</sub> innerhalb der gesplitteten Bande auf (hier nur für RNA-Pol-II<sub>o</sub>Ser<sub>5</sub> in Abb. 15 c-c'' gezeigt).

### 3.3.5 Die Deletion von Promoter 1 als auch von Promoter 2 führt zu einer deutlichen Reduktion der Transkription

Eine Erklärung für die Bildung der dekondensierten Chromatinstruktur von 61C7/8 wäre, dass die Dekondensation zwangsläufig eine Folge der Öffnung des Chromatins bei aktiver Transkription der in dieser Region enthaltenen Gene Rev1, MED30 und CG3402 wäre. Um diese Möglichkeit zu überprüfen habe ich in Proben aus Speicheldrüsen der rekombinanten Linien 61C $\Delta$ P1, 61C $\Delta$ P2 und 61C $\Delta$ P1+2 mittels qRT-PCR die Rev1 Genexpression des ektopischen Lokus überprüft. Das ektopische Rev1 Gen ist als verkürztes Fragment direkt mit der Vektorsequenz fusioniert und ermöglicht dadurch eine klare Unterscheidung seiner Transkripte von denen des endogenen Rev1 Gens. Das von mir amplifizierte 100 bp Fragment beginnt in der P1-Region und reicht von dort in die angrenzende Vektorsequenz hinein. Bei der 61C $\Delta$ P1 Linie ist die Rev1 Transkription im Vergleich zur Positivkontrolle (pattP61C) um das fünffache reduziert. Erstaunlicherweise bewirkt die Promoter 2 Deletion (pattP $\Delta$ P2) eine ähnlich starke Reduzierung der Rev1 Transkription, was einen Einfluss der P2 Sequenz auf die Transkription von Rev1 vermuten lässt (Abb. 15 f). Diese Annahme wird dadurch gestärkt, dass bei Deletion beider Promotersequenzen (pattP $\Delta$ P1+2) die Rev1 Transkription noch stärker reduziert ist als bei den Einzeldeletion  $\Delta$ P1 und  $\Delta$ P2. Damit ist klar, dass die Deletion der ~490 bp großen Promoter 1 Sequenz, aber nicht deren Beitrag zur transkriptionellen Aktivität des Rev1 Gens für den Verlust der Bildung und Aufrechterhaltung der offenen 61C7/8 Struktur verantwortlich ist. Allerdings kann noch nicht ausgeschlossen werden, dass eine durch den Promoter 1 induzierte MED30 Transkription zur Bildung der offenen Chromatinstruktur von 61C7/8 beiträgt. Diese Möglichkeit konnte nicht überprüft werden, da keine spezifische Quantifizierung der ektopischen MED30 Transkription im Vergleich zur endogenen Sequenz möglich war.



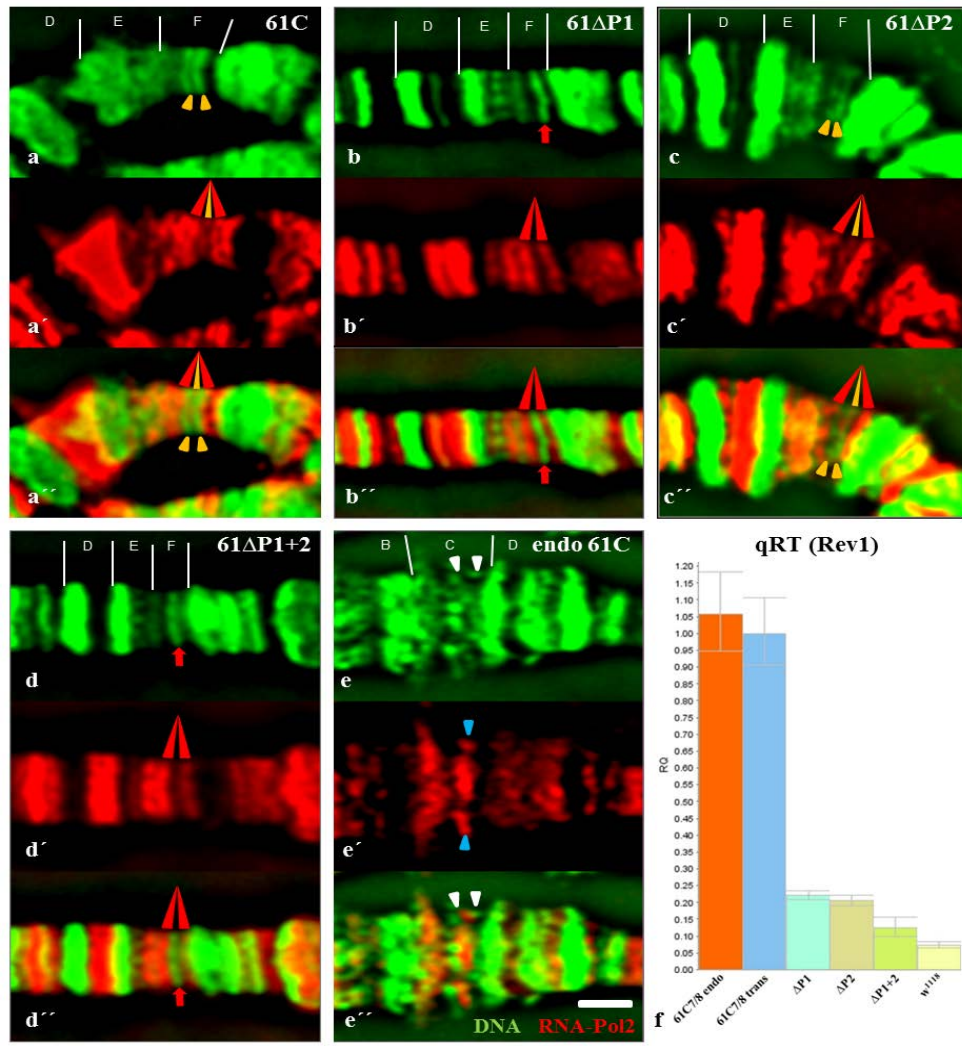


Abb. 15: Die Deletion des 490 bp Promoter 1 Fragments eliminiert die Fähigkeit der Bindung von Chromatinproteinen und reduziert die Transkription des Rev1 Gens. Immunzytologische und Expressionsanalyse der Promoter-Deletions Rekombinanten. a-a'') In der pattP61Cdp Kontrolle (gelber Keil) als auch (e-e'') im endogenen 61C7/8 Locus (blaue Pfeile) in ist eine deutliche Bindung der initiiierenden RNA-Pol II<sub>0</sub> zu erkennen. b-b'' und d-d'') Die Promoter 1 Deletion führt neben dem Verlust der Interbandenstruktur (rote Pfeile) auch zum Verlust der funktionellen Proteinbindung für die RNA-Pol II<sub>0</sub>. c-c'') Im Gegensatz dazu bleibt bei der pattPΔP2 Rekombinante neben der unverändert stabil gebildeten Interbande (zwischen gelben Pfeilen) auch die funktionelle RNA-Pol II<sub>0</sub> Bindung bestehen (gelber Keil). f) Transkription vom transgenen Rev1 in pattP61ΔP1 (Hellblau), pattP61CΔP2 (Braun) und pattP61CΔP1+2 (Grün) Rekombinanten sowie vom endogenen Rev1 (Orange) im Verhältnis zur transgenen Rev1 (Dunkelblau) Transkription in pattP61C Rekombinanten (auf 1.0 RQ gesetzt) ermittelt mit qRT-PCR. Speicheldrüsen von w<sup>1118</sup> Larven wurden als Negativkontrolle genutzt (Gelb). Balken 3 μm.

## 4. Diskussion

### 4.1 Das molekulare Profil des Chromatins definiert auch dessen strukturelle Organisation

Neben der in der Einleitung ausführlich beschriebenen Organisation des Chromatins in hierarchisch aufgebaute Strukturen unterschiedlicher Kondensation und der Unterteilung in Hetero- und Euchromatin belegen neue genomische Studien eine tiefergehende Klassifizierung des Chromatins in verschiedene Typen. Diese Chromatintypen sind charakterisiert durch spezifische Bindung von Proteinen bzw. Proteinkombinationen, durch Histonmodifikationen und anderen Faktoren wie z.B. DNase hypersensitive Stellen, P-Element-Insertionen oder Gendichte. Auf Basis dieser Unterteilung gliedert sich das Chromatin in Domänen mit einem DNA Gehalt von bis zu 100 kb. Jede chromosomale Domäne wird hinsichtlich ihrer molekularen Beschaffenheit (Proteinbindungen und Histonmodifikationen) einem bestimmten Chromatintyp und damit einem bestimmten Kondensationsgrad zugeordnet. Filion et al. (2010) nutzte für seine Chromatinklassifizierung ein Set von 53 unterschiedlichen Proteinen. Anhand hochauflösender, genomweiter Bindungskarten dieser Proteine in diploiden *Drosophila* Kc167-Zellen (ChIP) unterteilte Filion et al. das Chromatin in fünf Typen, welche jeweils ein bestimmtes kombinatorisches Set von Proteinbindungen aufweisen. Jedem dieser Chromatintypen wurde eine bestimmte Farbe zugeordnet. So stehen grünes und blaues Chromatin für zwei unterschiedliche Arten von Heterochromatin, gelbes und rotes Chromatin für zwei Arten von transkriptionell aktiven Euchromatin, und schwarzes Chromatin als die am häufig auftretendste Art transkriptionell inaktiven Chromatin. Neben Filion et al. hat auch Kharchenko et al. (2010) eine genomweite Chromatinlandkarte erstellt. Diese basiert auf 18 verschiedenen Histonmodifikationen, untersucht in *Drosophila* S2 und BG3 Zellen. Die resultierende Chromatin-Klassifizierung in 9 verschiedene Typen erfolgte ähnlich wie bei Filion et al. auf der Basis kombinatorischer Muster bestimmter Histonmodifikationen. Trotz unterschiedlicher Grundlagen der Analysen (Proteine bzw. Histonmodifikationen) ist sowohl bei Filion et al. als auch bei Kharchenko et al. eine ähnliche Klassifizierung des Chromatins zu erkennen. Die unterschiedliche Anzahl typisierter Chromatinarten ist lediglich auf den Feinheitsgrad der Klassifizierung zurück zu führen. Neue Studien von Zhimulev et al. (2014) basieren auf der spezifischen Bindung von typischen Interbanden-

proteinen innerhalb kartierter Interbanden, welche in den Zelllinien S2, Kc, Bg3 und Clone 8 (modencode) an den entsprechenden genomischen Regionen binden. Auf Basis dieser Bindungsprofile unterteilten die Autoren das Chromatin in vier unterschiedliche Typen (Cyan, Blau, Grün und Magenta) welche jeweils ein bestimmtes Set von kolokalisierenden Proteinen aufweisen und damit einen bestimmten Chromatintyp repräsentieren. Die Arbeiten von Fillion et al., Kharchenko et al. und Zhimulev et al. zeigen einen Trend neuer Studien, das Chromatin auf der Basis molekularer und epigenetischer Charakteristika (z.B. Proteinbindungen und Histonmodifikationen) zu beschreiben und nicht mehr anhand rein struktureller Hierarchien unterschiedlicher Kondensationsgrade.

Die Spezifizierung des Chromatins in verschiedene Typen anhand molekularer Eigenschaften und die daraus resultierende Gliederung in chromosomale Domänen unterschiedlicher Kondensationsgrade ist in der Form auch in polytänen Interphasenchromosomen als Banden/ Interbandenmuster von z.B. *Drosophila melanogaster* zu sehen. Inwieweit sich die Ergebnisse der genomweiten Chromatinstudien in diploiden Zellen mit der konservierten Bandenstruktur polytäner Chromosomen in Übereinstimmung zu bringen sind und somit zum Allgemeinverständnis chromosomaler Strukturen beitragen, bedarf vergleichender, detaillierter Analysen beider Zelltypen. Klassische Studien zu diesem Thema begannen bereits in den 1960-80er Jahren mit quantitativen Messungen des Chromatingehalts von Interbanden und Banden. Diese basierten auf Feulgenzytrophotometrie (Swift, 1962; Crick, 1971; Beermann, 1972) und densitometrischer Elektronenmikroskopie (Laird, 1980). Wie bereits in der Einleitung erwähnt ergaben sich in Abhängigkeit der angewandten Methodik Diskrepanzen bei der Abschätzung des DNA-Gehalts von Interbanden (~3-5% von Swift, 1962; Crick, 1971; Beermann, 1972 bzw. ~26% von Laird, 1980). Auch die Funktion und der transkriptionelle Zustand von Interbanden wurde in den letzten 40 Jahren kontrovers diskutiert. So wurde ursprünglich vorgeschlagen, dass dekontensierte Regionen polytäner Chromosomen (Interbanden und Puffs) transkriptionell aktive Strukturen darstellen, die permanent aktive Haushaltsgene tragen und kondensierte Regionen (Banden) die dazugehörigen Kontrollelemente beinhalten (Zhimulev, 1994; Crick, 1971). Proteinbindungsstudien von Transkriptionsmarkern (z.B. RNA-Polymerase 2, 3H-Uridin) innerhalb von Interbanden untermauerten diese These. Andere Studien relativieren dieses Modell und beschreiben, dass dekompaktes Chromatin von Interbanden nicht zwangsläufig mit einer hohen Transkriptionsrate korreliert. Demnach



erfüllen Interbanden eher regulatorische Aufgaben für die im kompakten Bandenchromatin lokalisierte transkribierte Sequenz (Kvon et al., 2011; Paul, 1972; Sorsa, 1984).

Um etwas über die Chromosomenstruktur und die Mechanismen der Domänenbildung zu erfahren, ist es von grundlegender Bedeutung die Grenzen chromosomaler Domänen zu kartieren und molekular zu beschreiben. Polytäne Chromosomen mit ihrem charakteristischen Banden/Interbanden Muster bieten hierfür ein geeignetes Modell, da sie einen direkten Vergleich zytogenetischer und molekularer Analysen gestalten. Die Gruppe von Zhimulev hat zu diesem Thema zahlreiche Studien an den Modelldomänen 3C6/7 und 61C7/8 polytärer Chromosomen vorgenommen. Die Kartierung dieser beiden Interbandendomänen erfolgte ursprünglich auf Basis von P-Element Insertionen (Demakov et al., 2004) bzw. auf hochauflösende in-situ Hybridisierung entlang des polytänen Chromosoms (Rykowski et al., 1988). Aufgrund der geringen Größe von Interbanden und der limitierten Auflösung gegenwärtiger Untersuchungsmethoden ist diese Kartierung jedoch sehr ungenau. So liegt das Auflösungsvermögen bei der für die 3C6/7 Interbandenkartierung genutzte in situ Hybridisierung von Rykowski et al. bestenfalls bei 3 kb. Auch die bei der 61C7/8 Kartierung genutzte elektronenmikroskopische Lokalisierung von P-Elementen gibt keine genaue Aussage über die Entfernung der Insertion zur Domänengrenze (Demakov et al., 2004). Die Auflösung der P-Element markierten Kartierung liegt nach Beermann (1972) bei höchstens 2 kb. Die 3C6/7 Interbande wurde anhand der Kartierungsstudien von Rykowski (1988), Zimin (2004) und Keppy und Welshons (1977) auf einen DNA-Gehalt von 1,5 kb bestimmt. Diese Interbande verfügt über keine genkodierenden Sequenzen. Vielmehr verfügt sie über Promoter- und Enhancer-Elemente und fungiert dadurch als regulatorische Sequenz für das in der 3C7 Bande befindliche Notch Gen (Rykowski et al., 1988). Die 61C7/8 Interbande wurde von der Zhimulev Forschungsgruppe ursprünglich auf ca. 1,8-2,1 kb geschätzt (Demakov et al., 1993) und später von derselben Gruppe auf einen DNA-Gehalt von ~4,7 kb erweitert (Semeshin et al., 2008). Ähnlich wie bei der 3C6/7 Interbande verfügt die von Semeshin bestimmte 61C7/8 Interbandensequenz über keine Proteinkodierenden Sequenzen. Aus diesem Grund wurde für beide Interbandendomänen ein transkriptionell unabhängiger Prozess für ihre Bildung und Aufrechterhaltung vorgeschlagen (Demakov et al., 2004). Neben diesen als transkriptionell unabhängig gebildeten Interbanden (Gruppe 1 Interbanden) existiert eine zweite Gruppe von Interbanden, welche über

permanent aktive Haushaltsgene verfügt und demnach über einen transkriptionell abhängigen Prozess gebildet und aufrecht erhalten wird (Demakov et al., 2004). Weiterhin wird für beide Typen von Interbanden eine unterschiedliche nukleosomale Verpackung beschrieben, welche auf unterschiedliche Histonmodifikationen bzw. Proteinbindungen beruhen soll (Demakov et al., 2004).

Die Beschreibung polytärer Chromosomen auf Basis molekularer Charakteristika (ChIP-Analysen) steckt im Gegensatz zu diploiden Zelllinien noch in den Anfängen und begrenzt sich in den wenigen Studien auch nur auf lokale Regionen und wenige epigenetische Faktoren. Dennoch wurden bereits zahlreiche Proteine identifiziert, die in ihrer Bindung stark mit Interbandenchromatin korrelieren und als Komplex über die Etablierung spezifischer Histonmodifikationen oder über schleifenbildende „long range“ Interaktionen maßgeblich an der Bildung des entsprechenden Chromatintyps beteiligt sind wie z.B. der Chriz-Komplex (Eggert et al., 2004) oder der NSL-Komplex (Raja et al., 2010). Für dekondensiertes Interbandenchromatin wurden interbandenspezifische Proteine (z.B. Chriz, Z4), Isolatorproteine (z.B. BEAF32, CP190, CTCF), Chromatin-Remodeller (z.B. WDS); histonmodifizierende Enzyme (z.B. Jil1), Histonvarianten (z.B. H2A2, H2AZ) oder Histonmodifizierungen (z.B. H3K9ac, H3S10ph und H3K4me3) in polytären Chromosomen nachgewiesen (Eggert et al., 2004; Gortchakov et al., 2005; Gan et al., 2011; Zhao et al., 1995; Elgin et al., 1975; Hollmann et al., 2002; Raja et al., 2010; Donahue et al., 1986; Jin et al., 1999; Deng et al., 2005). Ein molekulares Profil dieser Proteinbindungen oder Histonmodifikationen kann somit zur Identifizierung der Grenzen unterschiedlich kompaktierten Chromatins und somit zur Erstellung einer Karte chromosomaler Domänen beitragen. Erste Ergebnisse in dieser Richtung wurden kürzlich von Zhimulev et al. (2014) berichtet.

#### 4.2 Die 61C7/8 Interbande weist eine deutlich größere Ausdehnung auf als angenommen

In meiner Arbeit basiert die Kartierung der 61C7/8 Interbande auf zytogenetische Analysen (FISH) verknüpft mit den Daten molekularer Bindungsprofile in *Drosophila* S2 Zellen (modENCODE). Die von Demakov (1993) ursprünglich berechnete Größe der 61C7/8 Interbande von 1,8-2,1 kb und später von Semeshin (2008) genutzten ~4,7 kb stehen nicht in Übereinstimmung mit den in unserer Gruppe ermittelten Kartierungsdaten. Durch hochauflösende in situ Hybridisierung unter Verwendung spezi-

fischer DNA Sonden entlang der 61C7/8 Sequenz konnten vor allem weiter proximal lokalisierte Sequenzen der 61C7/8 Interbande zugeordnet werden (Diplomarbeit Katrin Lehmann; 2006; Diplomarbeit Navid Dehdashti-Zadeh, 2005). Die distale Grenze wurde von Zhimulev's Gruppe und unserer Gruppe übereinstimmend kartiert. Insgesamt beträgt der von unserer Gruppe ermittelte 61C7/8 DNA-Gehalt mindestens 17 kb und ist demnach weitaus größer als der von Semeshin et al. vorgeschlagene DNA-Abschnitt (Abb. 7a). Auch die molekularen Profile für charakteristische Proteinbindungen (z.B. Chriz, CP190 und BEAF) und Histonmodifikationen (z.B. HK27me3, H3K4me3 und H3K9ac) innerhalb dekondensierten Chromatins (S2 Zellen, modENCODE, Abb. 8a) deuten entgegen der Kartierung von Semeshin et al. auf eine weitaus größere proximale Ausdehnung der 61C7/8 Interbande hin. Zur Überprüfung unserer Kartierungsergebnisse wurde der proximale Abschnitt der ~17 kb umfassenden Sequenz mittels hochauflösender FISH auf Zugehörigkeit zur 61C7/8 Interbande untersucht. Das FISH-Signal der ~4 kb großen DNA-Probe, welche in der proximalen Region hybridisiert, lag eindeutig innerhalb der endogenen 61C7/8 Domäne und bestätigt damit unsere Kartierungsergebnisse (Abb. 9c-c''). Damit lag der Beweis vor, dass die 61C7/8 Interbande entgegen der Kartierung von Zhimulev's Gruppe eine deutlich erweiterte proximale Ausdehnung aufweist. Eine klare Aussage über die genaue Position der Domänengrenzen von 61C7/8 konnte ich mit diesem Experiment aber nicht treffen. Hierfür sind weiterführende Analysen notwendig, welche ich in Punkt 4.3 erläutern werde.

Die erweiterte Spannweite der 61C7/8 Interbande konnte kürzlich von mir mit eigenen Daten hochauflösender FISH unter Verwendung zahlreicher Hybridisierungsproben entlang der chromosomalen 61C6/7-61C9 Region untermauert werden. Die dabei erhaltenen Daten lassen sogar auf einen DNA-Gehalt der 61C7/8 Interbande von mindestens 20 kb schließen. Da diese Ergebnisse noch sehr neu sind und die von mir durchgeführte Kartierung sich noch im Prozess befindet sind diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht enthalten.

Um die Diskrepanz der Ergebnisse unserer Gruppe und der Gruppe von Zhimulev zu erklären muss die unterschiedliche Methodik der 61C7/8 Kartierung verglichen werden. Die Kartierung von Demakov (1993) basierte auf zufällige P-Element Insertion innerhalb der endogenen 61C7/8 Interbande. Dies resultierte in der ektopischen Bildung einer neuen Bande innerhalb der 61C7/8 Interbande. Die Messung der 61C7/8 Interbandengröße erfolgte durch Distanzberechnungen auf Basis elektronenmikro-

skopischer Analysen. Unter Berücksichtigung des typischen Kondensationsgrades von Interbandenchromatin (Semeshin et al., 1989) ergab sich eine Schätzung des DNA-Gehalts der 61C7/8 Interbande von 1,8-2,1 kb. Die Genauigkeit dieser Berechnung ist aufgrund der Fülle an variablen Faktoren anzuzweifeln. So können z.B. die Chromosomen unterschiedlich stark gespreitet sein, was bei der mikroskopischen Distanzberechnung bzw. der Berechnung des DNA-Gehalts zu Ungenauigkeiten führen kann. Auch der in der Größenberechnung einbezogene Dekondensationsgrad von Interbandenchromatin kann eine Fehlerquelle darstellen, nachdem Demakov (2004) eine unterschiedliche Nukeosomenverpackung für zwei unterschiedliche Interbandentypen propagierte. Nicht zuletzt kann nach Meinung der Autoren auch eine transkriptionelle Aktivität des P-Elements zur Veränderung benachbarter Chromatinstruktur führen und demnach Einfluss auf die Interbandengröße haben. Der transkribierte Teil der dabei zur lokalen Dekondensation an einem Ende der P-Element Insertion beiträgt, hat einen DNA-Gehalt von 1,7 kb und musste dementsprechend für die Berechnung der 61C7/8 Interbandengröße abgezogen werden. Unter Berücksichtigung dieser lokalen Dekondensation, der damit resultierenden Ausdehnung der 61C7/8 Interbande um 0,25 µm und dem typischen Kondensationsgrad von Interbandenchromatin (Semeshin et al., 1989) ergab sich eine Schätzung des DNA-Gehalts der 61C7/8 Interbande von 1,8-2,1 kb.

Durch den in unserer Gruppe ermittelten größeren Abschnitt der 61C7/8 Interbande ergeben sich auch neue Betrachtungen bezüglich der transkriptionellen Eigenschaften dieser Interbande. Zusätzlich zu der Nicht-Protein kodierenden Sequenz in dem von Semeshin et al. (2008) bestimmten Abschnitt, befinden sich im proximalen Bereich der von uns kartierten 61C7/8 Sequenz vier Gene Rev1, MED30, CG3402 und Gale, welche in Speicheldrüsen von Larven des dritten Stadiums moderat bis stark exprimiert werden (FlyBase). Dies wirft ein ganz anderes Licht auf den möglichen Mechanismus der 61C7/8 Interbandenbildung, welcher durchaus transkriptionell bedingt sein könnte und damit zur zweiten Gruppe von Interbanden gehören würde. Darauf werde ich in Punkt 4.4 noch im Detail eingehen.

Für die 3C6/7 Interbande habe ich keine weitere Kartierung mittels FISH vorgenommen, da diese Interbande bereits von mehreren Gruppen detailliert beschrieben und charakterisiert wurde (Keppy und Welshons, 1977; Rykowski, 1988; Semeshin et al., 2008; Demakov et al., 2004). Die Daten der vorliegenden Kartierung stimmen voll-

ständig mit dem molekularen Profil für Interbanden spezifische Proteinbindungen und Histonmodifikationen (modENCODE) überein.

#### 4.3 Banden und Interbanden stellen autonome Einheiten in polytären Chromosomen von *Drosophila* dar

Um zu verstehen wie sich chromosomale Domänen bilden und aufrecht erhalten, ist es notwendig sie funktionell und zytologisch zu charakterisieren. Dabei stellt sich die Frage, ob sich chromosomale Domänen in Abhängigkeit ihres genetischen Umfelds kontextabhängig bilden oder vollkommen autonome Strukturen darstellen, die sich auch in ektopischen Positionen bilden können. Klassische Modelle zur Organisation von Chromatin propagieren, dass eine Bande mit der benachbarten Interbande eine funktionelle Einheit bilden (siehe 4.1; Crick, 1971; Paul, 1972; Sorsa, 1984). Diese von Crick, Paul und Sorsa beschriebene funktionelle Organisation des Chromatins spricht gegen einen autonomen Charakter von Banden und Interbanden und vielmehr für eine Abhängigkeit dieser Domänen von ihrem chromosomalen Umfeld. Andererseits beinhaltet der Begriff einer Domäne gerade die Beschreibung einer mehr oder weniger unabhängigen Einheit der Struktur und Funktion. Für eine kontextabhängige Bildung chromosomaler Domänen spricht auch der stabile und reproduzierbare Charakter des Banden/Interbandenmusters einer Spezies, welches sich auch in gewissem Umfang in anderen Geweben und unterschiedlichen Entwicklungsstadien ausbildet (Zhimulev und Koryakov, 2009; Beermann, 1950, 1952, 1961, 1972). Beobachtete Unterschiede des Bandenmusters können begründet sein auf lokale Unterschiede gewebes- bzw. entwicklungsstadienabhängiger Transkription, auf variable Änderungen intra- bzw. extrazellulärer Konditionen (Ilyinskaya, 1977, 1980; Zhimulev und Koryakov, 2009) oder auf technische Schwierigkeiten der Bandenkartierung infolge variabler Einflüsse bei der Chromosomenpräparation. Man könnte annehmen, dass die evolutionäre Stabilität und Konserviertheit des chromosomalen Bandenmusters darauf zurückzuführen ist, dass sich diese Strukturen nur in Abhängigkeit ihrer chromosomalen Umgebung korrekt ausbilden.

Um zu überprüfen, ob Banden und Interbanden Strukturen sind, die sich kontextabhängig bilden oder autonome Domänen darstellen ist es notwendig einzelne solcher Abschnitte in ektopische Regionen einzufügen und somit von dem natürlichen genetischen Kontext der endogenen „Banden-Interbanden“ Einheit zu separieren.

Wenn die transferierte Domäne fähig ist ihre strukturellen und funktionellen Eigenschaften in einem veränderten genetischen und epigenetischen Umfeld auszubilden, dann verfügt sie über alle essentiellen Sequenzen zur Domänenbildung und repräsentiert damit eine autonome Struktureinheit.

Ein erster Ansatz zur Analyse von chromosomalen Domänen hinsichtlich ihrer Autonomie war die ektopische Bildung kondensierter Domänen (Banden) innerhalb von Interbanden durch P-Element Insertion. Semeshin et al. (1989) beschrieben in ihren Analysen, dass P-Elemente mit einer Mindestlänge von ~5 kb nach genomischer Insertion einen Prozess der DNA-Kondensation durchlaufen und dadurch stabile Strukturen bilden, die von endogenen Banden nicht zu unterscheiden sind. Die Interbande, in die das P-Element integriert, bleibt ebenfalls erhalten und wird infolge der neu gebildeten Bandendomäne in zwei Teile gesplittet. Eine transkriptionelle Aktivierung innerhalb der neuen Bande resultierte in der lokalen Dekondensation und einer Puff-Bildung. Diese Analysen weisen zwar auf einen autonomen und funktionellen Charakter der infolge der P-Element Insertion neu gebildeten Bandendomäne hin, geben aber keine Auskunft über den Bildungsprozess von dekondensierten Interbandendomänen. Diese Methode der P-Element induzierten Bandenbildung war vielmehr ein Mittel zur Kartierung benachbarter endogener Interbandensequenzen (siehe Punkt 4.2; Beermann, 1972; Demakov et al., 2004).

Semeshin et al. (2008) haben in späteren Analysen die in Punkt 4.2 erwähnten kartierten Interbandendomänen (3C6/7 und 61C7/8) daraufhin getestet, ob sie innerhalb eines neuen chromosomalen Umfelds dekondensierte Strukturen ausbilden und somit autonomen Charakter aufweisen. Der Vorteil bestand darin, dass die getesteten Sequenzabschnitte zwei natürlich vorkommenden Interbanden entsprachen und die Analyse somit näher an den Prinzipien der Bildung natürlich vorkommender Interbandendomänen angelehnt war. Dafür konstruierte Semeshin einen P-Element Vektor, der die entsprechenden Interbandensequenzen beinhaltet, flankiert von transkriptionell inaktiven Sequenzen. Die genomische Insertion dieser P-Elemente resultierte in der Bildung einer ektopischen Interbande, flankiert von kondensiertem Chromatin. Damit hat Semeshin den autonomen Charakter dieser beiden Interbandensequenzen nachgewiesen.

Auch meine Arbeit basiert auf der Untersuchung der 3C6/7 und 61C7/8 Interbande, wobei der Schwerpunkt aus den in Punkt 4.2 erwähnten Gründen auf der 61C7/8 Interbande lag. In meiner Arbeit nutzte ich einen ähnlichen Ansatz wie Semeshin,

mittels genomischer Insertion von Banden- bzw. Interbandensequenzen tragender Vektoren ektopische Domänenstrukturen zu generieren. Der große Vorteil meiner Methode liegt darin, dass mittels sequenzspezifischer PhiC31-Rekombination unterschiedliche Sequenzen in ein und denselben chromosomalen Locus inseriert werden können. Dies verhindert variable Einflüsse von Positionseffekten und ermöglicht vergleichende Analysen unterschiedlicher DNA-Abschnitte und die Kartierung essentieller Sequenzen für die Domänenbildung.

Mittels P-Element Insertion transkriptionell inaktiver Sequenzen, konnte ich eine kondensierte Bandendomäne etablieren und zeigen, dass die integrierten Sequenzen über alle essentiellen Faktoren zur Bildung kondensierten Chromatins verfügen und damit autonomen Charakter aufweisen. Diese ektopische Modellbande diente in einem zweiten Schritt als Ausgangspunkt für die gezielte Rekombination von attP gekoppelten Interbandensequenzen. Die Integration von DNA-Abschnitten aus Bereichen, die in Speicheldrüsen kondensiertes Chromatin bilden, verhielten sich erwartungsgemäß und integrierten als kondensierte Struktur.

Abschnitte aus dekontensierten Bereichen bildeten ebenfalls autonom dekontensierte Strukturen. Im Fall der 61C7/8 Interbande nutzte ich ein Fusionsfragment bestehend aus einem ~5 kb großen DNA-Fragment der distalen 61C7/8 Region und ein ~4kb großes DNA-Fragment der proximalen 61C7/8 Region. Auf Basis unserer Kartierungsergebnisse und der molekularen Daten in diploiden *Drosophila* Zellen (modENCODE) beinhalten diese Fragmente die Domänengrenzen und binden dementsprechend die potentiellen Faktoren (z.B. Isolatorelemente), welche zur Bildung und Aufrechterhaltung des dekontensierten Chromatins notwendig sind. Die von Keppy und Welshons (1977) bzw. Rykowski (1988) auf ~1,5 kb kartierte 3C6/7 Sequenz, sowie das ~9 kb große Fusionsfragment der insgesamt ~17 kb großen 61C7/8 Sequenz etablierten nach gezielter genomischer Rekombination dekontensiertes Chromatin innerhalb der Modellbande. Dies beweist, dass die untersuchten Interbandensequenzen über die vollständige Information zur Bildung dekontensierten Chromatins verfügen. Im Fall von 3C6/7 stellt dieses Ergebnis eine Bestätigung früherer Experimente (Semeshin et al., 2008) dar. Im Fall der 61C7/8 Interbande zeigt dieses Ergebnis in Verbindung mit den aus unserer Gruppe erhaltenen Kartierungsdaten, dass die von mir genutzte ~9 kb große 61C7/8 Interbandensequenz alle Bedingungen zur Etablierung dekontensierten Chromatins hinreichend erfüllt. Ein potentieller Einfluss der DNA-Sequenz zwischen den von mir genutzten distalen und

proximalen Fragment auf die Bildung und Aufrechterhaltung der 61C7/8 Interbande kann nicht ausgeschlossen werden. Diesbezüglich bedarf es zusätzlicher Analysen, die ich in Punkt 4.4 erläutern werde.

#### 4.4 Ektopisch gebildetes Interbandenchromatin besitzt eine ähnliche Chromatinstruktur und transkriptionelle Aktivität wie der endogene Lokus

Die künstlich geschaffene 61C7/8 Interbande wurde nicht nur auf ihre Struktur hin untersucht, sondern auch auf die Bindung von Chromatinproteinen sowie auf transkriptionelle Eigenschaften. Die in dieser Arbeit mittels Immunzytologie untersuchten Proteine Chriz, Z4, Jil1, BEAF, CP190 spielen eine wichtige Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierter Chromatindomänen. Die in meiner Arbeit durchgeführte immunzytologische Analyse ergab, dass das Bindungsverhalten der oben beschriebenen Proteine in der transgenen und der endogenen 61C7/8 Interbandenregion nahezu identisch ist. Das ist ein weiteres Argument dafür, dass der epigenetische Zustand der ektopischen 61C7/8 Interbande unabhängig von der chromosomalen Umgebung konserviert ist. Die Beobachtungen stimmen zudem mit den Bindungsprofilen der Proteine in ChIPchip Analysen überein (mod-ENCODE), welche eine klare Bindung der identifizierten Proteine in der 61C7/8 Region bei diploiden S2 Zellen nachweisen. Auffällig ist die ausgeprägte Kollokalisierung spezifischer Interbanden- und Isolatorproteine (Chriz, BEAF und CP190) innerhalb der 61C7/8 Region, insbesondere an den beiden Grenzregionen. Dies lässt vermuten, dass die dort gebundenen Proteine einen wichtigen Einfluss auf die Etablierung der dekondensierten Chromatinstruktur ausüben.

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass die in vielen Geweben exprimierten Interbandenproteine Chriz und Z4 miteinander interagieren und als Komplex für die Rekrutierung der Histon-H<sub>3</sub>S<sub>10</sub> spezifischen Tandem Kinase Jil1 verantwortlich sind (Gan et al., 2011; Rath et al., 2006). Nach Chriz RNAi-knockdown ist die Bindung von Jil1 und damit auch gleichzeitig die H3S10 Phosphorylierung im Chromatin reduziert, was auf den essentiellen Einfluss von Chriz auf die chromosomale Rekrutierung und Aktivität von Jil1 hindeutet (Gan et al. 2011). Lokale H3S10-Phosphorylierung führt zur Dekondensierung des Chromatins (Deng et al., 2008) und trägt damit zur offenen Struktur von Interbanden bei. Hypomorphe Mutationen innerhalb des Jil1 und des Chriz Gens resultieren ähnlich wie bei Z4 Mutanten (Eggert et



al., 2004) in einen Verlust des distinkten Banden-Interbandenmusters polytärer Chromosomen (Wang et al., 2001; Rath et al., 2006; Gan et al., 2011). Desweiteren deuten Studien darauf hin, dass lokale H3S10 Phosphorylierung indirekt die Transkription dort befindlicher Gene reguliert, indem sie der für inaktives Chromatin typischen Histonmodifikation H3K9Me2 und dem Gen-silencing entgegenwirkt (Zhang et al., 2006; Deng et al., 2010; Wang et al., 2011a, 2011b, 2012). Das Chriz Protein ist entscheidend für die Lokalisierung der Jil1 Kinase. Es ist jedoch unklar, wie Chriz im Chromatin gebunden wird. Eine direkte und spezifische DNA Bindung wurde bei Chriz bisher nicht nachgewiesen und es wird vermutet, dass Chriz über andere Proteine oder Histonmodifikationen an das Chromatin rekrutiert wird (Vogelmann et al., 2014).

Die Proteine CP190 und BEAF32 gehören zur Gruppe der Isolator-Proteine, welche oft an den Domänengrenzen und an Promoterregionen lokalisiert sind und dort die Transkription stimulieren (Kyrchanova und Georgiev, 2014). Neue Studien von Vogelmann et al. (2014) zeigen, dass das Isolatorprotein BEAF32 direkt mit Chriz interagiert und so für dessen Rekrutierung an aktives Chromatin verantwortlich sein könnte. Die DNA-Bindung von BEAF32 erfolgt mit Hilfe von BED Fingerdomänen (Gilbert et al., 2006) an CGATA DNA-Motive bzw. Cluster solcher Motive (Jiang et al., 2009; Bushey et al., 2009; Gurudatta et al., 2012). BEAF32 bildet im Komplex mit weiteren Isolator-Proteinen (z.B. CP190) die sogenannten Isolator-Elemente.

Vogelmann et al. (2014) beschrieb neben der Chriz/BEAF32 Interaktion auch eine direkte Interaktion von CP190 mit Chriz und BEAF32. CP190 wird dabei von BEAF32 direkt rekrutiert (wie auch Chriz). Neben BEAF32 interagiert CP190 auch noch mit diversen anderen Isolator-Proteinen wie z.B. dCTCF, Su(Hw) und Mod(Mdg4) im Komplex. Die Komplexbildung von Isolator-Proteinen zu Dimeren bzw. Multimeren erfolgt über Interaktion spezifischer Proteindomänen (z.B. BTB/POZ-Domäne, „zinc-finger“-Domäne, C- und N-terminale Domäne) was zur Ausbildung chromosomaler Schleifen führen kann (Vogelmann et al., 2014; Kyrchanova et al., 2013).

Vogelmann et al. (2014) beschreiben den Wirkmechanismus von Isolatorelementen als einen zweistufigen Prozess. Die erste Stufe besteht aus der direkten DNA-Bindung eines speziellen Proteins (z.B. BEAF32 an CGATA Motive) welches über Protein-Protein Interaktion ein oder mehrere andere Proteine rekrutiert (z.B. CP190 oder Chriz). Dieser Komplex kann nun wiederum mit anderen Proteinen interagieren bzw. diese rekrutieren. Auf diese Weise können Isolatorelemente neben der häufig

beschriebenen „Enhancer blocker“ bzw. „Barrier element“ Funktion (West et al., 2002; Zhao et al., 2004; Cai und Levine, 1995) noch weitaus mannigfaltiger wirken. So können sie z.B. essentiell für die Promoteraktivität eines Gens sein, indem sie an der Bindung als auch Rekrutierung von Transkriptionskomplexen an der Promoterregion beitragen (Vogelmann et al., 2011; Kyrchanova et al., 2013). Weiterhin können sie über sehr große Distanzen interagieren (>Mbp) und somit, wie bereits für BEAF/CP190 und Chriz weiter oben beschrieben, unter Bildung chromosomaler Schleifen transregulierend wirken. Dies bedeutet, dass ein Isolatorelement im Einzelfall in Abhängigkeit seiner Position entweder positiven als auch negativen Einfluss auf die Enhancer/Promoter Kommunikation haben kann. Eine genaue Vorhersage seiner Funktion ist infolge zahlreicher Abhängigkeiten schwer möglich. So können sich z.B. zwei interagierende identische Isolatorelemente gegenseitig neutralisieren, wenn sie zwischen Promoter und Enhancer lokalisiert sind (Kuhn et al., 2003). Reprimierend können Isolatorelemente wirken, indem sie über long-range Interaktionen PRE-„Silencer“ Elemente in Promoternähe bringen. Andererseits können zwei identische Isolatorelemente weit voneinander entfernte Promoter und Enhancer in räumliche Nähe bringen und somit die Interaktion stimulieren. Nicht zuletzt ist auch die Zahl der kombinierten Insulatorelemente von Bedeutung. Nach genomweiten Untersuchungen werden an Grenzen von Domänen präferentiell komplexe Kombinationen vieler Insulatorelemente gefunden (Van Bortle et al., 2014).

Neben ihrer Struktur und der Bindung molekularer und epigenetischer Faktoren werden chromosomale Domänen auch hinsichtlich ihrer transkriptionellen Eigenschaften definiert (siehe 4.1). Um die ektopische 61C7/8 Interbande diesbezüglich zu analysieren habe ich eine vergleichende quantitative Expressionsanalyse des ektopischen und endogenen Rev1 Gens durchgeführt. Die quantitative Analyse des proximal gelegenen ektopischen Rev1 Gens zeigt eine ähnlich moderate Expression wie das endogene Rev1. Dies zeigt, dass die ektopische 61C7/8 Interbande neben der dekompakten Struktur und des molekularen Bindungsverhaltens spezifischer Proteine auch transkriptionelle Eigenschaften zur endogenen 61C7/8 Interbande kopiert.

#### 4.5 Die Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierten Chromatins bedarf lokal begrenzter Regionen innerhalb einer Interbande

Nachdem der autonome Charakter von Interbandensequenzen mittels ektopisch etablierten dekondensierten Chromatins von mir nachgewiesen wurde, ergab sich die Frage welche Faktoren (z.B. Bindung von Proteinen, Histonmodifikationen, Promotorelemente) innerhalb der Interbanden DNA-Sequenz essentiell für deren Bildung und Aufrechterhaltung sind.

Der erste Schritt einer solchen Analyse ist die Kartierung essentieller DNA-Abschnitte für die Bildung dekondensierten Chromatins. Für die 3C6/7 Interbande wurden dafür bereits von Welshons und Keppy (1975) Analysen durchgeführt. Sie zeigten, dass in der *fa(swb)* Mutante die 3C6/7 Interbande ihre Kapazität dekondensiertes Chromatin zu bilden verliert. Die *fa(swb)* Mutation stellt eine ~880bp große Deletion dar, welche sich innerhalb der 3C6/7 Interbande direkt „upstream“ zum Notch Transkriptionsstartpunkt befindet und als Insulatorelement Notch vor Positionseffekten schützt. Zytologisch ist dieser Effekt in einem Verlust der 3C6/7 Interbande und der Fusionierung der 3C6 Bande mit der 3C7 Bande zu erkennen. Andreyenkov et al. (2010) konnte in seinen Studien diesen ~880 bp großen essentiellen DNA-Abschnitt auf 246 bp feinkartieren. Nach Deletion dieses 246 bp großen DNA-Abschnitts verlor die ~1,5 kb große 3C6/7 Sequenz die Kapazität dekondensiertes Chromatin zu bilden. Im Gegensatz dazu resultierte die genomische Insertion eines 917 bp großen Fragments der *fa(swb)* DNA-Sequenz in der Ausbildung einer ektopischen dekondensierten Chromatindomäne. Ausgehend von den 3C6/7 Kartierungsergebnissen von Rykowski et al. (1988) stellt dieses 917 bp Fragment bzw. der auf 246 bp feinkartierte essentielle 3C6/7 DNA-Sequenzabschnitt lediglich einen Teil der ~1,5 kb großen 3C6/7 Interbande dar. Diese Ergebnisse beweisen, dass die 3C6/7 Interbande sowohl für ihre Bildung als auch für ihre Aufrechterhaltung lediglich lokale Abschnitte benötigt und nicht in ihrer Gesamtheit essentiell ist. In meiner Arbeit war die um ~800bp deletierte 3C6/7 Interbandensequenz (*fa(swb)* Mutante) nicht fähig ektopisch dekondensiertes Chromatin auszubilden und bestätigt damit den von Keppy und Welshons nahe gelegten essentiellen Charakter dieser Sequenz. Offen bleibt, welche spezifischen Faktoren innerhalb dieser lokalen Abschnitte letztendlich entscheidend für die Bildung dekondensierten Chromatins sind. So sind speziell in der *fa(swb)* Region der 3C6/7 Interbande Insulatorproteine (CP190 und CTCF) und In-

terbandenspezifische Proteine (Chriz) gebunden, welche für die Bildung und Aufrechterhaltung der Domäne wichtig sein könnten. Aus den in Punkt 4.2 erwähnten Gründen, lag der Focus meiner Studie aber nicht auf einer weiterführenden Analyse der 3C6/7 Sequenz, sondern auf der 61C7/8 Sequenz. Die dafür von mir gewonnenen Ergebnisse werde ich folgend auf Basis bereits bekannter Literaturdaten analysieren.

Eine Feinkartierung essentieller Abschnitte der 61C7/8 Interbande für deren Bildung und Aufrechterhaltung wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nicht durchgeführt. Bereits aus der unterschiedlichen Kartierung dieser Domäne von Semeshin und unserer Gruppe (siehe 4.2) ergaben sich hierfür neue Erkenntnisse. Sowohl die von Semeshin et al. (2008) genutzte ~4,8 kb große 61C7/8 DNA-Sequenz als auch das von mir genutzte ~9kb große 61C7/8 proximal/distale Fusionsfragment war fähig autonom dekondensiertes Chromatin zu bilden. Die von Semeshin genutzte 4,7 kb große 61C7/8-Sequenz stimmt vollständig mit dem von mir genutzten distalen Fragment überein und stellt somit lediglich einen lokalen Abschnitt der von mir genutzten Sequenz dar. Dies deutet wie bei der 3C6/7 Interbande darauf hin, dass lokale Abschnitte von 61C7/8 ausreichend für deren Bildung und Aufrechterhaltung sind. Die von mir durchgeführten Deletionsanalysen ergaben jedoch, dass lediglich der proximale Abschnitt der 61C7/8 Interbande autonom dekondensiertes Chromatin bilden und aufrecht erhalten kann (siehe 3.3.1). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Semeshin et al. (2008), dessen distal gelegene 61C7/8 DNA-Sequenz autonom dekondensiertes Chromatin ausbilden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass in dem von Semeshin genutzten Interbanden-Konstrukt ein hsp70 Promoter direkt angrenzend zur 61C7/8 Sequenz lokalisiert ist. Dieser Promoter könnte infolge seiner Basalaktivität Einfluss auf die umgebende Chromatinstruktur haben und diese dekompatieren. Aus diesem Grund ist es fragwürdig, ob die von Semeshin et al. (2008) genutzte 4,8 kb 61C7/8 Interbandensequenz tatsächlich autonom dekondensiertes Chromatin bildet. Dieser Umstand würde auch erklären, warum für die von Semeshin genutzte ~4,8 kb große 61C7/8 Sequenz keinerlei Isolatorfunktion nachgewiesen werden konnte (Berkaeva et al., 2009). In dem von mir durchgeführten Versuchsaufbau ist ein ungewollter Einfluss auf die Chromatinstruktur infolge einer basalen Promoteraktivität ausgeschlossen, da in dem von mir konstruierten Interbandenvektor (pattP61Cdp) keine Promoterelemente angrenzend zur 61C7/8 Sequenz vorhanden sind. Um den Einfluss des hsp70 Promo-

ters zu klären, könnte ein solcher Promoter angrenzend zum distalen 61C7/8 Fragment innerhalb des pattP61Cdp Vektors eingefügt werden und anschließend auf Dekompaktierung untersucht werden.

Da sich sowohl im distalen als auch im proximalen 61C7/8 Abschnitt prominente Bindungsstellen für interbandenspezifische Proteine (z.B. Chriz) und Isolatorproteine (z.B. BEAF) befinden, ergab sich die Frage warum lediglich der proximale Abschnitt autonom dekondensiertes Chromatin ausbilden kann. Ein Grund dafür könnte das Vorhandensein transkriptionell aktiver Gene innerhalb der proximalen Region sein. Wie in 3.3.3 beschrieben verfügt die 61C7/8 Interbande über vier proteinkodierende Gene. Bei drei dieser Gene befinden sich der transkriptionelle Startpunkt und die entsprechenden Promoterregionen innerhalb der proximalen 61C7/8 Sequenz. Zur Klärung des möglichen Einflusses dieser Sequenzen bzw. der Transkription selbst wurden zwei potentielle Promoterregionen (P1 und P2) einzeln und in Kombination deletiert. Lediglich die ~490bp große Promoterregion P1 resultiert in einen Verlust des ektopisch gebildeten dekondensierten Chromatins innerhalb der Modellbande. Dies beweist den essentiellen Charakter der Promotersequenz P1 und lässt auf eine mögliche Bedeutung der Transkription der beiden „upstream“ der Promoter 1 gelegenen Gene Rev1 und Med30 bei der Bildung des dekondensierten Chromatins schließen. Diese Annahme wird bestärkt durch immunzytologische Analysen, welche eine klare Bindung der Serin 5 phosphorylierten Form der RNA-Pol 2 innerhalb der endogenen, als auch der ektopischen 61C7/8 Interbande aufweisen. Weiterhin resultiert die Promoter 1 Deletion in einer starken Reduktion der Rev1 Transkription (siehe 3.3.5). Die Untersuchung der Transkription der Gene MED30 und CG3402 in der ektopischen Domäne unter Ausschluss ihrer Transkription am endogenen Locus konnte aufgrund fehlender spezifischer Primer nicht durchgeführt werden. Zur Unterscheidung der endogenen Transkription dieser beiden Gene könnten Polymorphismen innerhalb der ektopischen 61C7/8 Sequenz eingefügt werden und somit spezifisch die Transkription der beiden ektopischen Gene quantitativ analysiert werden.

Interessanterweise führt die P2 Deletion ebenfalls zu einer drastischen Abnahme der Rev1 Transkription. Dies könnte durch ein regulatorisches Zusammenspiel beider Promotoren erklärt werden. Studien von Li et al. (2012) zeigen, dass Promoter-Promoter Interaktionen zu einer Cluster-Bildung von gewebsspezifischen Genen sowie Haushaltsgenen führt und somit regulierend auf deren Transkription wirkt. Eine Möglichkeit der Regulation besteht z.B. in der transkriptionellen Synchronisation von

zwei oder mehreren gekoppelten Genen. Die Untersuchung eines möglichen kooperativen Zusammenspiels unterschiedlicher Promoteren könnte z.B. über „chromosome conformation capture“ Analysen (3C) erfolgen oder über quantitative Transkriptionsanalysen im Promoter-deletierten genomischen Hintergrund. Zur Untersuchung des Einflusses der Transkription der innerhalb der 61C7/8 Interbande lokalisierten Gene (Rev1, MED30, CG3402) auf die lokale Chromatinstruktur, könnten Mutationen der entsprechenden Promoter relevanten Sequenzmotife (z.B. TATA-Box, CAAT-Box) generiert werden (Abb. 16). Die infolge der Mutation inaktivierten Promoteren wären nicht mehr in der Lage Komponenten der Transkriptionsmaschinerie (z.B. RNA-Polymerase 2) zu binden und somit würde keine Transkription der entsprechenden Gene stattfinden.

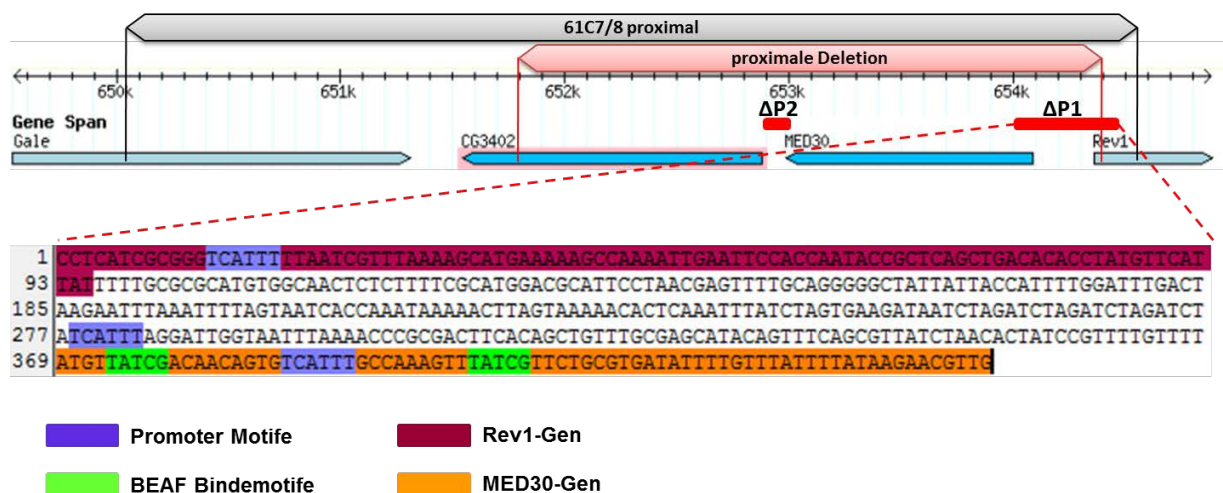


Abb. 16: DNA-Sequenz der deletierten Promoter 1 Region weist typische Promoter Motife auf sowie Bindungsstellen für BEAF. Im oberen Abschnitt ist eine schematische Darstellung der proximalen 61C7/8 Region dargestellt. Innerhalb dieser Region sind die darin befindlichen Genen Gale, CG3402, MED30 und Rev1 sowie die proximale Deletion und beide Promoterdeletionen (ΔP1 und ΔP2) gekennzeichnet. Im unteren Teil ist die DNA-Sequenz der Promoter 1 Deletion mit den in der Legende aufgelisteten Genabschnitten, Promoter Motife und BEAF Bindemotife dargestellt.

Im Fall der 61C7/8 Interbande ist möglicherweise P1 der stärkere oder wichtigere Promoter, während P2 kooperativ die Rekrutierung der aktiv transkribierenden RNA-Pol 2 unterstützt, aber nicht essentiell an der Bildung offenen Chromatins beteiligt ist. Bei solch einer Annahme wäre die Bildung dekondensierten Chromatins durch die

Bindung spezifischer Proteine abhängig und nicht direkt von dem Prozess der aktiven Transkription. Die Bindung dieser spezifischen Proteine könnte durch Mutation der entsprechenden Bindestellen (einzeln oder in Kombination) unterbunden werden und somit deren Einfluss auf die Bildung und Aufrechterhaltung der dekondensierten 61C7/8 Chromatinstruktur untersucht werden.

Hinsichtlich des möglichen Einflusses spezifischer Proteinbindungen auf die Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierten Chromatins innerhalb der 61C7/8 Interbande sei erwähnt, dass beide Promoterregionen (P1 und P2) prominente Bindestellen für Chriz, CP190 und BEAF32 aufweisen (Abb. 14a). Diese Proteine könnten an der Rekrutierung von Chromatin modifizierenden Enzymen beteiligt sein (z.B. Jil1) und die Ausbreitung des kondensierten Chromatins blockieren (siehe 4.3). Desweiteren sind sowohl in der Promoterregion 1 als auch in der Promoterregion 2 typische Histonmodifikationen für aktives Chromatin wie H3K9Ac und H3K4Me3 angereichert (Abb. 7a und 8a). Diese sind potentiell in der Lage Aktivatorproteine bzw. Chromatinremodellierungs-Komplexe zu rekrutieren, welche durch Auflockerung der Chromatinstruktur eine Plattform für die Bindung von Transkriptionskomplexen (RNA-Pol 2 und assoziierende Faktoren) bilden. So bindet z.B. der Chromatin-Remodellierungskomplex NURF an trimethylierten H3K4 und bewirkt über die Rekrutierung einer SNFL2 ATPase eine Aktivierung der HOXC8 Genexpression (Wysocka et al., 2006). Ein anderes Beispiel ist die spezifische Bindung des Heterochromatin Proteins HP1 an H3K9 methylierten Histonen. Die durch Jil1 gebildete H3S10 Phosphorylierung bewirkt wiederum, dass HP1 von direkt benachbarten H3K9 methylierten Histonen dissoziiert (Fischle et al., 2005) und somit nicht mehr an der Bildung von kondensiertem Chromatin beitragen kann. Wie aus diesen Beispielen ersichtlich, können Proteinbindungen bzw. Histonmodifikationen an der Etablierung und Aufrechterhaltung von kondensiertem als auch dekondensiertem Chromatin beteiligt sein.

Hinsichtlich der Untersuchung des Einflusses spezifischer Proteinbindungen auf die Bildung und Aufrechterhaltung der 61C7/8 Chromatinstruktur habe ich bereits anfängliche Studien vorgenommen. Wie bereits in Punkt 1.1.3.4 erwähnt binden Chriz und CP190 als Kofaktoren möglicherweise über das Insulatorprotein BEAF32, welches direkt an CGATA Konsensussequenzen an die DNA bindet (Vogelmann et al., 2014). Die von mir begonnenen Studien beinhalten Punktmutationen von BEAF32 Bindemotiven (CGATA) innerhalb der Promoter 1 Region (Abb. 16). Details hierfür

werden im Punkt 4.5 beschrieben. Aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Analyse sind hierfür noch keine Ergebnisse dargestellt. Neben BEAF32 gibt es auch noch andere Proteinkandidaten die prominente Bindestellen innerhalb der proximalen 61C7/8 Region in S2 Zellen aufweisen wie z.B. Chriz oder CP190. Für den Fall das BEAF diese Proteine an das Chromatin rekrutiert (Vogelmann et al., 2014), werden sie bei entsprechender Mutation der BEAF Bindestellen ebenfalls nicht mehr an das Chromatin binden bzw. Einfluss auf die Chromatinstruktur ausüben.

Im Gegensatz zum proximalen 61C7/8 Fragment, welches die Protein-kodierenden Gene Rev1, MED30 und CG3402 beinhaltet, weist das distale Fragment ausschließlich nicht kodierende Gene auf. Das innerhalb des distalen Fragments lokalisierte Bantam Gen (*ban*) ist ein nichtkodierendes miRNA-Gen, welches durch Bindung der mRNA 3'-UTR von Zielgenen genregulatorisch auf posttranskriptioneller Ebene wirkt (He und Hannon, 2004). Die ebenfalls innerhalb des distalen Fragments partiell lokalisierten nicht-kodierenden Gene CR43423 bzw. CR43334 haben keine bekannte biologische oder molekulare Funktion. Es ist aber allgemein bekannt, dass viele Abschnitte evolutionär hochkonservierter nichtkodierender DNA eine wichtige Rolle bei der Genregulation und der Ausbildung von Chromatinstrukturen einnehmen (Subirana und Messeguer, 2009). Dies kann z.B. durch Interaktion der nichtkodierenden Transkripte mit Promoterelementen von Protein-kodierenden Genen erfolgen. Eine solche Interaktion kann Einfluss auf den epigenetischen Status der Promoterregion ausüben, z.B. bei menschlichen Zellen durch induzierte DNA-Methylierung und damit Reprimierung der Genexpression (Schmitz et al., 2010). Auf der anderen Seite können nichtkodierende Transkripte auch genaktivierend wirken, wie z.B. bei der LPS (bakterielles Lipopolysacharid) induzierten Chromatin-Reorganisation beim Huhn. Dabei erfolgt über Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und Repositionierung von Nukleosomen eine Abspaltung des Insulatorkomplexes CTCF/Cohesin sowie eine H3 Acetylierung der betreffenden Chromatinregion. Über diesen Prozess wird das Lysozym Gen aktiv gehalten (Lefevre et al., 2008). Anhand dieser Beispiele wird die Relevanz nichtkodierender Transkripte auf die Chromatinorganisation deutlich und kann auch im Fall der distalen 61C7/8 Region bei *Drosophila* nicht ausgeschlossen werden. In dem von mir durchgeführten Versuchsaufbau spielt die distale Region jedoch keine eigenständige Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierten Chromatins und wirft die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieses Abschnitts auf. Eine mögliche Erklärung wird im folgenden Absatz beschrieben.



Ein Punkt der bei der von mir durchgeführten Analyse der 61C7/8 Interbande berücksichtigt werden muss ist, dass der ~8 kb große Sequenzabschnitt zwischen dem distalen und proximalen 61C7/8 Fragment aus den in Punkt 4.3 erwähnten Gründen nicht für die ektopische Etablierung dekondensierten Chromatins genutzt wurde. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich prominente Bindestellen für Interbandenspezifische Proteine (Chriz) und Isolatorproteine (BEAF, CP190, dCTCF). Desweiteren befindet sich der transkriptionelle Startpunkt für das Gen CG12030 und dementsprechend auch Promoterelemente innerhalb dieser Region. Das Gen CG12030 ist in Speicheldrüsen von Larven des dritten Stadiums sehr stark exprimiert (FlyBase und modENCODE). Auch wenn der mittlere Abschnitt in dem von mir vorgenommenen Versuchsaufbau nicht essentiell für die Bildung von dekondensierten Chromatins ist, ist ein möglicher Einfluss der dort lokalisierten Proteinbindungen bzw. ein transkriptioneller Einfluss auf die umgebende Chromatinstruktur nicht ausgeschlossen. Es ist auch denkbar, dass die dort gebundenen Proteine (z.B. BEAF, CP190) mit Proteinen innerhalb des distalen oder proximalen Fragments unter Bildung chromosomaler Schleifen über Distanz interagieren. Dies könnte erklären, warum der von mir untersuchte distale Abschnitt keinen Einfluss auf die Chromatinstruktur hatte. Es ist nicht ausgeschlossen, dass der distale Bereich nur in Verbindung mit dem mittleren 61C7/8 Abschnitt über „long range“ Interaktionen seinen Einfluss auf die Chromatinstruktur ausübt. Für die Berücksichtigung der Funktion bzw. des Einflusses der mittleren 61C7/8 DNA-Sequenz auf die Chromatinstruktur, müsste die gesamte ~17kb große 61C7/8 Interbandensequenz für die ektopische Etablierung dekondensierten Chromatins verwendet werden und molekular untersucht werden. Experimente dazu sind in Vorbereitung.

#### 4.6 Die strukturelle Integrität der 61C7/8 Interbande wird durch einen polaren Effekt innerhalb des proximalen Fragments aufrechterhalten

Aus den von mir durchgeführten Deletionsanalysen ergibt sich die Frage, wie die am proximalen Ende der 61C7/8 Interbande lokalisierte ~490bp große Promoter 1 Region für die strukturelle Integrität der gesamten Interbandensequenz verantwortlich sein kann.

Die einfachste Erklärung wäre, dass der distale Abschnitt nicht Teil der 61C7/8 Interbande ist und womöglich kondensiertes Chromatin repräsentiert. Dieser Annahme

widersprechen jedoch sämtliche in unserer Gruppe vorgenommenen Kartierungsanalysen der 61C7/8 Region mittels FISH (Diplomarbeit Katrin Lehmann, 2006; Diplomarbeit Navid Dehdashti-Zadeh, 2005; eigene unveröffentlichte Ergebnisse) und auch den Kartierungsergebnissen der Zhimulev Gruppe (Demakov et al., 1993; Semeshin et al., 2008).

Eine plausible Erklärung dieses polaren Effekts liefern Protein-Protein Interaktionen über weite Distanzen (LRI = „long-range interactions“) (Vogelmann et al., 2014; Liang et al., 2014). Im Fall der 61C7/8 Interbande könnte dieser „long-range“ Effekt folgendermaßen erklärt werden. Das innerhalb des proximalen 61C7/8 Fragments lokalisierte BEAF32 Insulatorprotein stellt das DNA-bindende Protein dar. Diese Bindung ist bei *Drosophila* S2-Zelllinien als prominenter Bindungspeak in der entsprechenden Region zu erkennen (modENCODE). Das Insulatorprotein CP190 bindet in einem zweiten Schritt als Co-Faktor an das BEAF32 Protein. Diese Interaktion konnte bereits von Vogelmann et al. (2014) mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden und ist in Punkt 4.2 im Detail beschrieben. CP190 kann nun mit Hilfe von Protein-Protein Interaktionen über weite Distanzen (LRI) mit seiner BTB/POZ-Domäne andere CP190-Komplexe binden, welche im distalen Bereich lokalisiert sind. Das DNA-bindende Protein im distalen Bereich muss nicht zwangsläufig BEAF sein, da CP190 nachweislich auch mit anderen DNA-bindenden Proteinen wie z.B. dCTCF, Su(Hw), Mod(Mdg4) oder GAF interagieren kann (Vogelmann et al., 2014). Die bei diesem komplexbildenden Prozess interagierenden Proteine finden räumlich zusammen und resultieren bei ChIP-Analysen in einem Auftreten von direkten und indirekten Bindungspeaks der entsprechenden Proteine. Direkte Peaks entspringen der direkten DNA-Bindung von Proteinen wohingegen indirekte Peaks aus der räumlichen Lokalisation von Proteinen infolge der „long-range“ Proteininteraktionen resultieren (Liang et al., 2014). Im Fall der 61C7/8 Interbande könnte der BEAF Bindungspeak innerhalb des proximalen Fragments ein direkter Peak sein und der etwas schwächere Bindungspeak innerhalb des distalen Fragments ein indirekter Peak. Somit hätte die proximale Bindung von BEAF und anderen an BEAF gebundenen Faktoren aufgrund der Interaktion mit distal gebundenen Proteinen einen direkten Einfluss auf die Struktur und Stabilität der distalen Grenze. Die Deletion der Promoter 1 Region deletiert gleichzeitig die Region des direkten BEAF-Bindungspeaks im proximalen Fragment und verhindert damit eine mögliche Interaktion mit dem distalen Fragment. Dies hätte zur Folge, dass die mögliche Barrierefunktion des aus der Interaktion gebilde-

ten Insulatorkomplexes sowohl im proximalen als auch im distalen Fragment verloren geht. Dies resultiert an beiden Grenzen in einer Ausbreitung von kondensiertem Chromatin und damit in einem Verlust der Kapazität der 61C7/8 Sequenz dekondensiertes Chromatin zu bilden. Weil sich im distalen 61C7/8 Abschnitt nur der indirekte BEAF Bindungspeak befindet, hat eine distale Deletion keinen Einfluss auf die proximale Barrierefunktion und damit auch keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität des Chromatins im proximalen Abschnitt.

Auch eine mögliche Interaktion des proximalen und distalen Bereichs über eine BEAF/Chriz Komplexbildung ist denkbar (Vogelmann et al., 2014). In diesem Szenario wäre das Interbandenprotein Chriz (und nicht CP190) der Co-Factor des DNA bindenden Insulatorproteins BEAF. Chriz kann ähnlich wie CP190 nun über Dimerbildung am Aufbau von „long-range“ Interaktionen beitragen. Chriz ist bekanntermaßen für die Rekrutierung der Jil1-Kinase essentiell, welche über H3S10 Phosphorylierung maßgeblich am Aufbau dekondensierten Chromatins beteiligt ist. Im Fall der 61C7/8 Interbande würde bei einem Ausbleiben der „long-range“ Interaktion zwischen dem proximalen und distalen Bereich infolge der Promoter 1 Deletion, die Rekrutierung der Jil1-Kinase und damit der Aufrechterhaltung dekondensierten Chromatins im distalen Bereich verloren gehen.

Um diese Hypothesen des polaren Effekts auf die Integrität der 61C7/8 Interbande zu testen könnte man die spezifischen DNA-Bindemotive (CGATA) für das BEAF Protein im proximalen 61C7/8 Abschnitt mutieren und somit die Assoziation von BEAF an die DNA unterbinden. Ein aus dieser Mutation resultierender Verlust der strukturellen Integrität von 61C7/8 würde den essentiellen Charakter von BEAF bestätigen und die „long-range“ Interaktions-Hypothese untermauern. Zu diesem Zweck wurden von mir bereits Versuche begonnen, die spezifische CGATA-Bindemotivmutationen innerhalb der Promoter1 und Promoter 2 Region beinhalten. Diese Versuche sind noch nicht abgeschlossen und dementsprechend hier noch nicht dargestellt.

#### 4.7 Ausblick

Für eine tiefergehende Beschreibung der molekularen Struktur und Dynamik der offenen 61C7/8 Domäne sind weiterführende Analysen notwendig, wie z.B. die molekulare Kartierung der Domänengrenzen der endogenen 61C7/8 Domäne mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) in Kombination mit FISH in polytären Geweben. Zu

diesem Zweck kann in einem genomweiten oder lokal begrenzten ChIP-Array für die in 4.1 angesprochenen interbandenspezifischen epigenetischen Faktoren ein molekulares Profil erstellt werden. Die Spezifität dieser Faktoren für dekondensiertes Interbandenchromatin bzw. kondensiertes Chromatin dient bei der ChIP Analyse zur Kartierung der physischen Grenzen unterschiedlich kompaktierten Chromatins (Vatolina et al., 2011; Fillion et al., 2010; Kharchenko et al., 2010; MacAlpine et al., 2010) welche anschließend mit dem molekularen Profil diploiden Chromatins verglichen werden können. Der Vergleich würde Auskunft geben über den Grad der Übereinstimmung der Chromatinstruktur in diploiden und polytänen Zellen und damit die Frage beantworten, ob das polytäne Banden/Interbanden Muster ein Grundmuster der Chromatinorganisation aller Zellen widerspiegelt. Deshalb gilt es noch zu klären, inwieweit die endogenen Domänengrenzen der 61C7/8 Interbande mit denen der von mir ektopisch erzeugten 61C7/8 Interbande übereinstimmen und damit aufzeigen in welchem Grad die künstliche Interbande die endogene kopiert. Dafür können ChIP Analysen durchgeführt werden, die insbesondere die Grenzregionen der Interbande im Übergangsbereich zur ektopischen Bande auf Bindung epigenetischer Faktoren untersuchen. Für die Unterscheidung der endogenen und ektopischen 61C7/8 Interbande können für die ChIP Analyse Primer gewählt werden, welche entweder Fusionsfragmente der ektopischen Interbande und der angrenzenden Modellbande amplifizieren oder über Einführung von Polymorphismen spezifische Fragmente innerhalb der ektopischen Interbande amplifizieren. Diese Untersuchungen werden auch zeigen, inwieweit die Integration der ektopischen 61C7/8 Interbande Einfluss auf das Ausmaß und die Struktur der kondensierten Chromatinkassette hat. Auch die Domänengrenzen der Modellbande gegenüber der 21F3-22A1-2 Interbande sollten kartiert werden.

Die Studie von Vatolina et al. (2011) zeigten eine weitgehend identische Chromatinorganisation der Interbanden als offene Chromatindomänen in polytänen und nicht-polytänen Chromosomen. Ihre Studie basierte auf einer Kombination zytogenetischer Interbandenkartierung in polytänen Chromosomen (FISH, Immunfärbung und Lokalisation von P-Element-Insertionen) und molekularer Bindungsprofile interbandenspezifischer Faktoren in diploiden *Drosophila* Zellen (S2 und Kc; modENCODE). In einer weitergehenden genomweiten Studie klassifizierten Zhimulev und Mitarbeiter (2014) das Chromatin diploider Zellen in vier Grade und verglichen es mit der Struktur polytäner Chromosomen. Insbesondere das als „Cyan“ klassifizierte Chromatin, aber

auch das als „Blau“ klassifizierte Chromatin lokalisieren mit Interbandendomänen. Wegen der begrenzten Auflösung der von Vatolina et al. (2011) und Zhimulev et al. (2014) genutzten zytogenetischen Methoden (FISH und Immunfärbung) bei der Bestimmung der Interbandengrenzen sowie des nicht klar definierten molekularen Profils von Domänengrenzen, bleibt die Generalisierbarkeit dieser Aussagen im Detail noch offen. Beide Studien offenbaren jedoch eine interessante Korrelation der zytogenetischen Strukturuntersuchungen an polytären Chromosomen und der molekularen Bindungsprofile die an diploiden Chromosomen ermittelt wurden (modENCODE). Das Konzept einer übereinstimmenden grundlegenden Domänenorganisation in unterschiedlichen Zelltypen wäre damit grundsätzlich belegt. Dies muss jedoch an geeigneten Beispielen durch hochauflösende in situ Analysen polytärer Chromosomen im Vergleich mit der molekularen Definition der Domänengrenzen in diploiden Zellen durch ChIP Analysen bestätigt werden und bildet demnach einen Ausgangspunkt für experimentelle Ansätze.

Wie in der Einleitung erläutert tragen Protein-Protein Interaktionen, welche über große Distanzen gebildet werden können, zur strukturellen Anordnung des Chromatins über Ausbildung chromosomaler Schleifen bei. Vogelmann et al. (2014) entwickelte mit seinen Interaktionsstudien ein Modell, in dem BEAF32 als direkt DNA-bindendes Protein für die Rekrutierung von Ko-Faktoren wie z.B. Chriz oder CP190 verantwortlich ist und über Ausbildung von Homo- bzw. Heterodimeren Interaktionen zu anderen chromosomalen Regionen aufgebaut werden können. Auch das molekulare Bindungsprofil innerhalb der 61C7/8 Interbande weist prominente Bindungsstellen für BEAF32 und Chriz sowohl im distalen als auch im proximalen Abschnitt auf (Abb. 12 a). Dies lässt vermuten, dass die 61C7/8 Interbande durch Interaktion des distalen Abschnitts mit dem proximalen Abschnitt strukturell als autonome Domäne gebildet wird. Um eine genaue Aussage über solche potentiellen „long-range“ Interaktionen innerhalb der 61C7/8 Sequenz zu treffen, wären sogenannte „chromosome conformation capture“ Analysen (3C, 4C oder Hi-C) nötig (siehe 1.1.3.2).

## 5. Zusammenfassung

Polytäne Interphase-Chromosomen von *Drosophila* bieten ein außergewöhnlich gutes Test-Modell zum Studieren der Mechanismen, die für die Bildung und Aufrechterhaltung unterschiedlicher Chromatindomänen notwendig sind. Zu diesem Zwecke habe ich ein System entwickelt, mit dessen Hilfe ich das Chromatin von polytänen Chromosomen manipulieren und rekonstruieren kann. Dieses System basiert auf der gezielten Insertion von zu untersuchenden DNA-Sequenzen in eine von mir neu erzeugte kondensierte Chromatindomäne innerhalb des *Drosophila* Genoms mittels  $\Phi$ C31 Rekombination. Durch die gezielte Rekombination werden variable Einflüsse, wie zum Beispiel Positionseffekte (PEV) ausgeschlossen. Dies ermöglicht unterschiedliche DNA-Sequenzen innerhalb eines identischen genetischen Kontext, hinsichtlich ihrer Kapazität dekondensiertes Chromatin zu bilden, vergleichend zu analysieren.

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag zunächst in der Untersuchung spezifischer DNA-Sequenzen auf ihre Kapazität dekondensiertes Chromatin autonom zu bilden. Dafür wurden über gezielte Rekombination DNA-Sequenzen aus der 61C7/8 bzw. 3C6/7 Interbandenregion in eine zuvor etablierte kondensierte Modelldomäne integriert. Beide DNA-Abschnitte waren in der Lage innerhalb eines ektopischen chromosomalen Umfelds dekondensiertes Chromatin auszubilden, was in einer Aufspaltung der Modellbande erkennbar war. Dieses Ergebnis beweist den autonomen Charakter der analysierten Interbandensequenzen und verdeutlicht, dass alle essentiellen Komponenten für die Bildung und Aufrechterhaltung dekondensierten Chromatins innerhalb der genutzten DNA-Sequenzen vorhanden sind. Die von mir durchgeführte Kartierung der 61C Region weist auf eine weitaus größere proximale Ausdehnung der 61C7/8 Interbande hin, als ursprünglich publiziert. Im Gegensatz zu der bislang kartierten 61C7/8 Region, beinhaltet die von mir kartierte Region vier Protein kodierende Gene. Dies eröffnet neue Blickwinkel hinsichtlich des potentiellen Mechanismus zur Bildung und Aufrechterhaltung der 61C7/8 Interbande, insofern ein transkriptioneller Einfluss nicht mehr ausgeschlossen werden kann.

Neben den zytologischen Analysen wurde auch der molekulare, epigenetische Charakter der ektopisch gebildeten 61C7/8 Interbande mittels Immunzytologie und quantitativen Transkriptionsanalysen untersucht. Die daraus gewonnenen Ergebnisse zeigen eine weitgehend identische Proteinbindung und ähnliche Transkriptionsraten wie

am endogenen 61C7/8 Locus. Dies legt nahe, dass die ektopisch gebildete 61C7/8 Domäne neben dem zytologisch offenen Charakter auch hinsichtlich der molekularen Eigenschaften die endogene 61C7/8-Domäne imitiert.

Für die Kartierung essentieller Sequenzen für die Bildung und Aufrechterhaltung des dekondensierten 61C7/8- bzw. 3C6/7-Chromatins, wurden partiell deletierte Variationen dieser Interbandensequenzen integriert und zytologisch als auch molekular untersucht. Mit Hilfe der Deletionsanalysen konnte im Falle der 61C7/8 Interbande zunächst eine ~2,3 kb große Sequenz im proximalen Grenzbereich und im Falle der 3C6/7 Interbande die ~800 bp große fa(swb)-Sequenz als essentiell identifiziert werden. Nach dem Verlust dieser DNA-Abschnitte verlor die entsprechende Interbande die Kapazität dekondensiertes Chromatin zu. Im Fall der 61C7/8 Interbande konnte der für die Bildung dekondensierten Chromatins essentielle Sequenzabschnitt auf ein 490 bp großes DNA-Fragment am proximalen Ende feinkartiert werden. Die Deletion der essentiellen Abschnitte von 61C7/8 resultierte neben dem Verlust der zytologischen Interbandenstruktur auch im Verlust prominenter molekularer Faktoren wie z.B. Proteinbindungen.

Innerhalb des feinkartierten 490 bp großen DNA-Abschnitts befinden sich Bindungsstellen für potentiell wichtige Chromatinproteine wie z.B. Chriz, die Histonkinase Jil-1 und das „boundary“-Element CP190. Mittels Mutation von Proteinbindungsmotifen kann ein möglicher Einfluss entsprechender Proteinbindungen auf die Bildung und Aufrechterhaltung der 61C7/8 Interbande untersucht werden.

Desweiteren überlappt das 490 bp große Fragment mit einer Promoterregion, welche zwischen den Genen Rev1 und MED30 lokalisiert ist. Quantitative Transkriptionsanalysen ergaben, dass der Verlust dieser Promoterregion in der Stilllegung der transkriptionellen Aktivität des Rev1 Gens resultiert. Dies deutet auf einen eventuellen Einfluss vorhandener Genexpression innerhalb der 61C7/8 Interbande auf dessen Chromatinstrukturbildung hin.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adams M.D. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2000 Mar 24;287(5461):2185-95.
- Ahmad K., Henikoff S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9:1191-1200.
- Ahringer J. (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet.* 16, 351.
- Andreas S., Schwenk F., Küter-Luks B., Faust N., Kühn R. (2002). Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 1;30(11):2299-306.
- Andreyenkov O.V., Volkova E.I., Demakov S.A., Semeshin V.F., Zhimulev I.F. (2010). The decompact state of interchromomeric chromatin from the 3C6/C7 region of *Drosophila melanogaster* is determined by short DNA sequence. *Dokl Biochem Biophys.* 431:57-9.
- Ashburner M. (1967). Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 21(4) 398-428.
- Ashburner M. (1998). *Drosophila: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
- Azaro M. A. (2002). In: Craig N. L., Craigie R., Gellert M. und Lambowitz A. M. (eds), *Mobile DNA II*, ASM Press, Washington, pp. 118-148
- Bai X., Larschan E., Kwon S.Y., Badenhorst P., Kuroda M.I. (2007). Regional control of chromatin organization by noncoding roX RNAs and the NURF remodeling complex in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2007 Jul;176(3):1491-9.
- Bartkuhn M., Straub T., Herold M., Herrmann M., Rathke C., Saumweber H., Gilfillan G.D., Becker P.B. and Renkawitz R. (2009). Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *EMBO J.* 28 877–888
- Bateman J.R., Anne M.L., Wu C. (2006). Site-Specific Transformation of *Drosophila* via  $\Phi$ C31 Integrase-Mediated Cassette Exchange. *Genetics*. 173(2): 769–777. [doi:10.1534/genetics.106.056945](https://doi.org/10.1534/genetics.106.056945) PMID: PMC1526508
- Becker P.B. (2002). Nucleosome sliding: facts and fiction. *EMBO J* 21:4749-4753.
- Becker P.B., Horz W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71:247-273.
- Bednar J., Horowitz R.A., Grigoryev S.A., Carruthers L.M., Hansen J.C., Koster A.J., Woodcock C.L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 24;95(24):14173-8.
- Bednar J., Horowitz R.A., Dubochet J., Woodcock C.L. (1995). Chromatin conformation and salt-induced compaction: three-dimensional structural information from cryoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 131,1365–1376.
- Beermann W. (1971). Effect of alpha-Amanitine on Puffing in Intranuclear RNA-Synthesis in Chironomus Salivary Glands. *Chromosoma* 34 152-167.
- Beermann W. (1952). Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* 5, 139-198.



- Beermann W. (1972). Chromomeres and genes. in: Results and Problems in Cell Differentiation, 4. Developmental studies on giant chromosomes (eds. W. Beermann, J. Reinert, H. Ursprung), pp.1-34, Berlin: Springer Verlag.
- Beermann W. (1950). Chromomerenkonstanz bei Chironomus. *Naturwissenschaften* 37, 543-544
- Beermann W. (1952b). Chromosomenstruktur und Zelldifferenzierung in der Speicheldrüse von *Trichocladus vitripennis*. *Z. Naturforsch.* 7b, 237-242
- Beermann W. (1961). Ein Balbiani-Ring als Locus einer Speicheldrüsenmutation, *Chromosoma* 12, 1-25
- Beermann W. (1972b). Developmental studies on giant chromosomes. "Results and problems in cell differentiation" Vol.4, Springer verlag, pp. 1-227. Berlin, Heidelberg and New York
- Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. (2001). Insulators and Boundaries: Versatile Regulatory Elements in the Eukaryotic Genome. *Science* 291, 447.
- Belteki G., Gertsenstein M., Ow D.W., Nagy A. (2003). Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase. *Nat Biotechnol.* 2003 Mar;21(3):321-4.
- Benos P. V., Gatt M. K., Murphy L., et al. (2001). From first base: the sequence of the tip of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11, 710–730.
- Benyajati C. und Worcel A. (1976). Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 9, 393-407.
- Berkaeva M, Demakov S, Schwartz YB, Zhimulev I. (2009). Functional analysis of *Drosophila* polytene chromosomes decompacted unit: the interband. *Chromosome Res.* 2009;17(6):745-54. doi: 10.1007/s10577-009-9065-7. Epub 2009 Aug 21.
- Bhadra M.P., Bhadra U., Kundu J., Birchler J.A. (2005). Gene expression analysis of the function of the male-specific lethal complex in *Drosophila*. *Genetics* 169(4):2061-74.
- Bharath M.M., Ramesh S., Chandra N.R., Rao M.R. (2002). Identification of a 34 amino acid stretch within the C-terminus of histone H1 as the DNA-condensing domain by site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* 41(24):7617-27.
- Blanton J., Gaszner M. und Schedl P. (2003). Protein:protein interactions and the pairing of boundary elements in vivo. *Genes Dev.* 17, 664-675.
- Bohla D., Herold M., Panzer I., Buxa M.K., Ali T., Demmers J., Krüger M., Scharfe M., Jarek M., Bartkuhn M., Renkawitz R. (2014). A functional insulator screen identifies NURF and dREAM components to be required for enhancer-blocking. *PLoS One* 9(9):e107765. doi:0.1371/journal.pone.0107765. eCollection 2014.
- Bridges C.B. (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* 26: 60-64.
- Bushey A.M., Ramos E., Corces V.G. (2009). Three subclasses of a *Drosophila* insulator show distinct and cell type-specific genomic distributions. *Genes Dev.* 2009 Jun 1;23(11):1338-50. doi: 10.1101/gad.1798209. Epub 2009 May 14.
- Cai H., Levine M. (1995). Modulation of enhancer-promoter interactions by insulators in the *Drosophila* embryo. *Nature.* 1995 Aug 10;376(6540):533-6.
- Caterino T.L., Hayes J.J. (2011). Structure of the H1 C-terminal domain and function in chromatin condensation. *Biochem Cell Biol.* 89(1):35-44. doi: 10.1139/O10-024.

Cockerill P.N., Garrard W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell*. 1986 Jan 31;44(2):273-82.

Combes P., Till R., Bee S., Smith M.C. (2002). The streptomyces genome contains multiple pseudo-attB sites for the (phi)C31-encoded site-specific recombination system. *J Bacteriol*. 2002 Oct;184(20):5746-52.

Crick F. (1971). General Model for the Chromosomes of Higher Organisms. *Nature* 234, 25

Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 319:1097-1113.

de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 370(Pt 3):737-49.

Demakov S. A., Semeshin V. F., Zhimulev I. F. (1993). Cloning and molecular genetic analysis of *Drosophila melanogaster* interband DNA. *Mol Gen Genet*. 238(3) 437-443.

Demakov, S.A., Gortchakov, A. A., Schwartz, Y. B., Semeshin, V.F. , Campuzano, S., Modolell, J. and Zhimulev, I.F. (2004). Molecular and genetic organization of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes: evidence for two types of interband regions. *Genetica* 122, 311-324.

Demakov, S.A., Vatolina, T.Y., Babenko, V.N., Semeshin, V.F., Belyaeva, E.S. und Zhimulev, I.F. (2011). Protein composition of interband regions in polytene and cell line chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* 12, 566-579.

Deng H., Bao X., Cai W., Blacketer M.J., Belmont A.S., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. (2008). Ectopic histone H3S10 phosphorylation causes chromatin structure remodeling in *Drosophila*. *Development*. 2008 Feb;135(4):699-705. doi: 10.1242/dev.015362. Epub 2008 Jan 16.

Deng H., Cai W., Wang C., Lerach S., Delattre M., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. (2010). JIL-1 and Su(var)3-7 interact genetically and counteract each other's effect on position-effect variegation in *Drosophila*. *Genetics*. 2010 Aug;185(4):1183-92. doi: 10.1534/genetics.110.117150. Epub 2010 May 10.

Deng H., Zhang W., Bao X., Martin J.N., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. (2005). The JIL-1 kinase regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *Chromosoma*. 2005 Aug;114(3):173-82. Epub 2005 Jun 29.

Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 485(7398):376-80. doi: 10.1038/nature11082.

Donahue P.R., Palmer D.K., Condie J.M., Sabatini L.M., Blumenfeld M. (1986). *Drosophila* histone H2A.2 is associated with the interbands of polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jul;83(13):4744-8.

Dorigo B., Schalch T., Kulangara A., Duda S., Schroeder R.R., and Richmond T.J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306, 1571–1573.

Earnshaw W.C. and Laemmli U.K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J. Cell Biol*. 96, 84–93.

Ebert A., Schotta G., Lein S., Kubicek S., Krauss V., Jenuwein T., Reuter G. (2004). Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev* 18:2973–2983

- Eggert H., Gortchakov A. und Saumweber H. (2004). Identification of the *Drosophila* interband-specific protein Z4 as a DNA-binding zinc-finger protein determining chromosomal structure. *J. Cell Sci.* 117, 4253-4264.
- Elgin S.C., Boyd J.B. (1975). The proteins of polytene chromosomes of *Drosophila hydei*. *Chromosoma*. 1975;51(2):135-45.
- Fan Y., Nikitina T., Morin-Kensicki E.M., Zhao J., Magnuson T.R., Woodcock C.L., Skoultschi A.I. (2003). Linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol Cell Biol.* 2003 Jul;23(13):4559-72.H1
- Feller C., Prestel M., Hartmann H., Straub T., Söding J., Becker P.B. (2011). The MOF-containing NSL complex associates globally with housekeeping genes, but activates only a defined subset. *Nucleic Acids Res.* 40(4):1509-22. doi: 10.1093/nar/gkr869. Epub 2011 Oct 27.
- Filion G.J., van Bommel J.G., Braunschweig U., Talhout W., Kind J., Ward L.D., Brugman W., de Castro I.J., Kerkhoven R.M., Bussemaker H.J., van Steensel B. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*. 2010 Oct 15;143(2):212-24. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.009. Epub 2010 Sep 30.
- Finch J. T. und Klug A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(6) 1897-1901.
- Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D., Brown R.S., Rushton B., Levitt M., Klug A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*. 269(5623):29-36.
- Fischle W., Tseng B.S., Dormann H.L., Ueberheide B.M., Garcia B.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Funabiki H., Allis C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*. 438(7071):1116-22. Epub 2005 Oct 12.
- Fish M.P., Groth A.C., Calos M.P., Nusse R. (2007). Creating transgenic *Drosophila* by microinjecting the site-specific phiC31 integrase mRNA and a transgene-containing donor plasmid. *Nat Protoc.* 2007;2(10):2325-31.
- Fleischmann G., Pflugfelder G., Steiner E. K., Javaherian K., Howard G. C., Wang J. C. und Elgin S. C. (1984). *Drosophila* DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(22) 6958-6962.
- Friedman A.M., Fischmann T.O., Steitz T.A. (1995). Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science* 268(5218):1721-7.
- Gan M., Moebus S., Eggert H. und Saumweber H. (2011). The Chriz-Z4 complex recruits JIL-1 to polytene chromosomes, a requirement for interband-specific phosphorylation of H3S10. *J. Biosci.* 36, 425-438.
- Gasser S.M. und Laemmli U.K. (1986). The organisation of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *The EMBO Journal* Vol.5 no.3 pp.511-518.
- Gavrilov A., Eivazova E., Priozhkova I., Lipinski M., Razin S., Vassetzky Y. (2009). Chromosome conformation capture (from 3C to 5C) and its ChIP-based modification. *Methods Mol Biol.* 2009;567:171-88. doi: 10.1007/978-1-60327-414-2\_12.
- Gerasimova T.I. und Corces V.G. (2001). Chromatin Insulators and Boundaries: Effects on Transcription and Nuclear Organization. *Annu. Rev. Genet.* 35:193–208.
- Ghosh P., Kim A.I., Hatfull G.F. (2003). The orientation of mycobacteriophage Bxb1 integration is solely dependent on the central dinucleotide of attP and attB. *Mol Cell.* 2003 Nov;12(5):1101-11.
- Ghosh P., Wasil L.R., Hatfull G.F. (2006). Control of phage Bxb1 excision by a novel recombination directionality factor. *PLoS Biol.* 2006 Jun;4(6):e186.

- Gilbert M.K., Tan Y.Y., Hart C.M. (2006). The *Drosophila* boundary element-associated factors BEAF-32A and BEAF-32B affect chromatin structure. *Genetics*. 2006 Jul;173(3):1365-75. Epub 2006 Apr 30.
- Gortchakov A., Eggert H., Gan M., Mattow J., Zhimulev V.F und Saumweber H. (2005). Chriz, a chromodomain protein specific for the interbands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 114, 54-66.
- Gotchakov A.A., Demakov S.A. und Schwartz Yu.B. (2003). Construction of pFRT, a Convenient *Drosophila* Transformation Vector with Functional FRT Sites. *Molecular Biology*, Vol. 37, No. 5 695-698.
- Grindley N.D.F. (2002). In: Craig N. L., Craigie R., Gellert M. und Lambowitz A. M. (eds), *Mobile DNA II*, ASM Press, Washington, pp. 272-302
- Groth A.C., Olivares E.C., Thyagarajan B., Calos M.P.(2000). A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23;97(11).
- Groth A.C., Fish M., Nusse R. und Calos M.P. (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage  $\Phi$ C31. *Genetics* 166, 1775-1782.
- Gupta M., Till R. und Smith M. C. M. (2007). Sequences in attB that affect the ability of  $\Phi$ C31 integrase to synapse and to activate DNA cleavage. *Nucleic Acids Research* 1-13.
- Gurudatta B.V., Ramos E., Corces V.G. (2012). The BEAF insulator regulates genes involved in cell polarity and neoplastic growth. *Dev Biol*. 2012 Sep 1;369(1):124-32. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.06.013. Epub 2012 Jun 26.
- Hall L.M., Mason P.J., Spierer P. (1983). Transcripts, genes and bands in 315,000 base-pairs of *Drosophila* DNA. *J Mol Biol*. 1983 Sep 5;169(1):83-96.
- Hamiche A., Sandaltzopoulos R., Gdula D.A., Wu C. (1999). ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell*. 97(7):833-42.
- He L. and Hannon G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):522-31.
- Heitz E., (1926). Der Nachweis der Chromosomen: Vergleichende Studien über ihre Zahl, Größe und Form im Pflanzenreich, *I. Z. Bot.* 18: 625-681
- Hollmann M., Simmerl E., Schäfer U., Schäfer M.A. (2002). The essential *Drosophila melanogaster* gene *wds* (will die slowly) codes for a WD-repeat protein with seven repeats. *Mol Genet Genomics*. 2002 Dec;268(4):425-33. Epub 2002 Oct 25.
- Hsu J.Y. et al. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102, 279.
- Hudson D.F., Vagnarelli P., Gassmann R., and Earnshaw W.C. (2003). Condensin is required for non-histone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes. *Dev. Cell* 5, 323–336.
- Iarovaia O., Hancock R., Lagarkova M., Miassod R., Razin S.V. (1996). Mapping of genomic DNA loop organization in a 500-kilobase region of the *Drosophila* X chromosome by the topoisomerase II-mediated DNA loop excision protocol. *Mol Cell Biol*. 1996 Jan;16(1):302-8.
- Igo-Kemenes T. und Zachau H.G. (1978). Domains in chromatin structure. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42, 109-118.
- Ilyinskaya N.B. (1977). A case of somatic mosaicism for heterozygous paracentric inversion of chromosome 2 in *Chironomus plumosus*. *Tsitologiya* 19(N 1), 45-49.
- Ilyinskaya N.B. (1980). Functional organization of polytene chromosomes and problems of karyosystematics. *Tr. Zool. Inst. Akad. Nauk SSSR* 95, 14-22

- Jackson D.A., Dickinson P., Cook P.R. (1990). The size of chromatin loops in HeLa cells. *EMBO J.* 1990 Feb;9(2):567-71.
- Jamrich M., Greenleaf A. L. und Bautz E. K. (1977). Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(5) 2079-2083.
- Jenuwein T., Allis C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
- Jiang N., Emberly E., Cuvier O., Hart C.M. (2009). Genome-wide mapping of boundary element-associated factor (BEAF) binding sites in *Drosophila melanogaster* links BEAF to transcription. *Mol Cell Biol.* 2009 Jul;29(13):3556-68. doi: 10.1128/MCB.01748-08. Epub 2009 Apr 20.
- Jin Y., Wang Y., Walker D.L., Dong H., Conley C., Johansen J., Johansen K.M. (1999). JIL-1: a novel chromosomal tandem kinase implicated in transcriptional regulation in *Drosophila*. *Mol Cell.* 1999 Jul;4(1):129-35.
- Johnson J.A., Turner B.M. (1999). Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10,179.
- Johnson R.C. (2002). In: Craig N. L., Craigie R., Gellert M. und Lambowitz A. M. (eds), *Mobile DNA II*, ASM Press, Washington, pp. 230-271
- Judd B.H. (1998). Genes and chromomeres: A puzzle in three dimensions. *Genetics.* 1998 Sep;150(1):1-9.
- Kamtekar S., Ho R.S., Cocco M.J., Li W., Wenwieser S.V., Boocock M.R., Grindley N.D., Steitz T.A. (2006). Implications of structures of synaptic tetramers of gamma delta resolvase for the mechanism of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 11;103(28):10642-7. Epub 2006 Jun 28.
- Kang J.G., Hamiche A., Wu C. (2002). GAL4 directs nucleosome sliding induced by NURF. *EMBO J.* 21(6):1406-13.
- Kaplan C.D., Morris J.R., Wu C., Winston F. (2000). Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* 2000 Oct 15;14(20):2623-34.
- Lehmann K., Diplomarbeit (2006). Kartierung der Interbande 61C7/8 mittels ins situ Hybridisierung und Proteinbindung in der Region 61 des 3L Chromosoms von *Drosophila melanogaster*.
- Keppy D.O. and Welshons W.J. (1977). The cytogenetics of a recessive visible mutant associated with a deficiency adjacent to the Notch locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 85, 497-506.
- Kharchenko P.V., Alekseyenko A.A., Schwartz Y.B., Minoda A., Riddle N.C., Ernst J., Sabo P.J., Larschan E., Gorchakov A.A., Gu T., Linder-Basso D., Plachetka A., Shanower G., Tolstorukov M.Y., Luquette L.J., Xi R., Jung Y.L., Park R.W., Bishop E.P., Canfield T.K., Sandstrom R., Thurman R.E., MacAlpine D.M., Stamatoyannopoulos J.A., Kellis M., Elgin S.C., Kuroda M.I., Pirrotta V., Karpen G.H., Park P.J. (2010). Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 2011 Mar 24;471(7339):480-5. doi: 10.1038/nature09725. Epub 2010 Dec 22.
- Kind J., Vaquerizas J.M., Gebhardt P., Gentzel M., Luscombe N.M., Bertone P. and Akhtar A. (2008). Genome-wide analysis reveals MOF as a key regulator of dosage compensation and gene expression in *Drosophila*. *Cell* 133 813–828
- Kireev I., Lakonishok M., Liu W., Joshi V.N., Powell R., Belmont A.S. (2008). In vivo immunogold labeling confirms large-scale chromatin folding motifs. *Nat Methods.* 2008 Apr;5(4):311-3. doi: 10.1038/nmeth.1196. Epub 2008 Mar 16.
- Knezetic J.A., and Luse D.S. (1986). The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 45, 95–104.
- Kornberg R.D. and Lorch Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285–294.

- Kouskouti A. and Talianidis I. (2004). Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *EMBO J.* 2005 Jan 26;24(2):347-57. Epub 2004 Dec 16.
- Kugler S.J., Gehring E.M., Walkkamm V., Krüger V., Nagel A.C. (2011). The Putzig-NURF nucleosome remodeling complex is required for ecdysone receptor signaling and innate immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 188(1):127-39. doi: 10.1534/genetics.111.127795.
- Kuhn E.J., Viering M.M., Rhodes K.M., Geyer P.K. (2003). A test of insulator interactions in *Drosophila*. *EMBO J.* 2003 May 15;22(10):2463-71.
- Kuhstoss S. and Rao R.N. (1991). Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage phi C31. *J Mol Biol.* 1991 Dec 20;222(4):897-908.
- Kvon E.Z., Demakov S.A., and Zhimulev I.F. (2011). Chromatin Decompaction in the Interbands of *Drosophila* Polytene Chromosomes Does Not Correlate with High Transcription Level. *Genetika*. 2011 Jun;47(6):765-73.
- Kyrchanova O. and Georgiev P. (2014). Chromatin insulators and long-distance interactions in *Drosophila*. *Elsevier* 588(1):8-14
- Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. (2013). Effective blocking of the white enhancer requires cooperation between two main mechanisms suggested for the insulator function. *PLoS Genet.* 2013;9(7):e1003606. doi: 10.1371/journal.pgen.1003606. Epub 2013 Jul 4.
- Laemmli U.K., Käs E., Poljak L., Adachi Y. (1992). Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev.* 2(2):275-285.
- Laird C., Ashburner M., Wilkinson, L. (1980). Relationship between relative dry mass and average band width in regions of polytene chromosomes of *Drosophila*. *Chromosoma* 76, 175-189.
- Lefevre P., Witham J., Lacroix C.E., Cockerill P.N., Bonifer C. (2008). The LPS-induced transcriptional upregulation of the chicken lysozyme locus involves CTCF eviction and noncoding RNA transcription. *Mol Cell.* 2008 Oct 10;32(1):129-39. doi: 10.1016/j.molcel.2008.07.023.
- Lemaitre J.M., Danis E., Pasero P., Vassetzky Y. and Mechali M. (2005). Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell* 123, 787–801.
- Levis R., Hazelrigg T., Rubin G.M. (1985). Effects of genomic position on the expression of transduced copies of the white gene of *Drosophila*. *Science*. 1985 Aug 9;229(4713):558-61.
- Li G., Ruan X., Auerbach R.K., Sandhu K.S., Zheng M., Wang P., Poh H.M., Goh Y., Lim J., Zhang J., Sim H.S., Peh S.Q., Mulawadi F.H., Ong C.T., Orlov Y.L., Hong S., Zhang Z., Landt S., Raha D., Euskirchen G., Wei C.L., Ge W., Wang H., Davis C., Fisher-Aylor K.I., Mortazavi A., Gerstein M., Gingeras T., Wold B., Sun Y., Fullwood M.J., Cheung E., Liu E., Sung W.K., Snyder M., Ruan Y. (2012). Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell*. 148(1-2):84-98. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.014.
- Li W., Kamtekar S., Xiong Y., Sarkis G.J., Grindley N.D., Steitz T.A. (2005). Structure of a synaptic gamma delta resolvase tetramer covalently linked to two cleaved DNAs. *Science*. 2005 Aug 19;309(5738):1210-5. Epub 2005 Jun 30.
- Liang J., Lacroix L., Gamot A., Cuddapah S., Queille S., Lhoumaud P., Lepetit P., Martin P.G., Vogelmann J., Court F., Hennion M., Micas G., Urbach S., Bouchez O., Nöhlmann M., Zhao K., Emberly E., Cuvier O. (2014). Chromatin immunoprecipitation indirect peaks highlight long-range interactions of insulator proteins and Pol II pausing. *Mol Cell.* 2014 Feb 20;53(4):672-81. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.029. Epub 2014 Jan 30.
- Lis J.T., Mason P., Peng J., Price D.H., Werner J. (2000). P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes Dev.* 2000 Apr 1;14(7):792-803.

Lorch Y., LaPointe J.W., and Kornberg R.D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203–210.

Lu X., Wontakal S.N., Emelyanov A.V., Morcillo P., Konev A.Y., Fyodorov D.V., Skoultchi A.I. (2009). Linker histone H1 is essential for *Drosophila* development, the establishment of pericentric heterochromatin, and a normal polytene chromosome structure. *Genes Dev.* 2009 Feb 15;23(4):452-65. doi: 10.1101/gad.1749309. Epub 2009 Feb 4.

Luger K. (2003). Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Apr;13(2):127-35.

Luger K., Rechsteiner T. J., Flaus A. J., Wayne M. M. Y. und Richmond T. J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.* 272, 301-311.

MacAlpine H.K., Gordân R., Powell S.K., Hartemink A.J., MacAlpine D.M. (2010). *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res.* 2010 Feb;20(2):201-11. doi: 10.1101/gr.097873.109. Epub 2009 Dec 7.

Maeshima K., Eltsov M., and Laemmli U.K. (2005). Chromosome structure: improved immunolabeling for electron microscopy. *Chromosoma* 114, 365–375.

Maeshima K., Eltsov M.J. (2007). Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes. 2008 Feb;143(2):145-53. Epub 2007 Nov 2.

Marmorstein R. and Roth S. (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev.* 11(2):155-61.

Marsden M.P. and Laemmli U.K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17, 849–858.

Miele A., Gheldof N., Tabuchi T.M., Dostie J., Dekker J. (2006). Mapping chromatin interactions by chromosome conformation capture. *Curr Protoc Mol Biol.* 2006 May;Chapter 21:Unit 21.11. doi: 10.1002/0471142727.mb2111s74.

Mohan M., Bartkuhn M., Herold M., Philippen A., Heintz N., Bardenhagen I., Leers J., White R.A., Renkawitz-Pohl R., Saumweber H., Renkawitz R. (2007). The *Drosophila* insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *EMBO J.* 26(19):4203-14.

Morgan G.T. (2002). Lampbrush chromosomes and associated bodies: new insights into principles of nuclear structure and function. *Chromosome Res.* 10, 177–200.

Murrell A., Heeson S. und Reik W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific loops. *Nature Gen.* 36, 889-893.

Natarajan K., Jackson B.M., Zhou H., Winston F., Hinnebusch A.G. (1999). Transcriptional activation by Gcn4p involves independent interactions with the SWI/SNF complex and the SRB/mediator. *Mol. Cell* 4:657–64

Navid Dehdashti-Zadeh Diplomarbeit, (2005). Kartierung von Interbanden-DNA in *Drosophila melanogaster* durch In situ Hybridisierung

Nolis I.K., McKay D.J., Mantouvalou E., Lomvardas S., Merika M., Thanos D. (2009). Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 1;106(48):20222-7. doi: 10.1073/pnas.0902454106. Epub 2009 Nov 18.

Noll M., and Kornberg R.D. (1977). Action of micrococcal nuclease. *Nature* 370, 481–485.

Nöllmann M., He J., Byron O., Stark W.M. (2004). Solution structure of the Tn3 resolvase-crossover site synaptic complex. *Mol Cell.* 2004 Oct 8;16(1):127-37.

Öberg C., Belikov S. (2012). The N-terminal domain determines the affinity and specificity of H1 binding to chromatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 420(2):321-4. doi: 0.1016/j.bbrc.2012.02.157. Epub 2012 Mar 7.

Ohsumi K., Katagiri C., and Kishimoto T. (1993). Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science* 262, 2033–2035.

Olivares E.C., Hollis R.P., Calos M.P. (2001). Phage R4 integrase mediates site-specific integration in human cells. *Gene.* 2001 Oct 31;278(1-2):167-76.

Olivares E.C., Hollis R.P., Chalberg T.W., Meuse L., Kay M.A., Calos M.P. (2002). Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol.* 2002 Nov;20(11):1124-8. Epub 2002 Oct 15.

Ortiz-Urda S., Thyagarajan B., Keene D.R., Lin Q., Fang M., Calos M.P., Khavari P.A. (2002). Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med.* 2002 Oct;8(10):1166-70. Epub 2002 Sep 16.

Palstra R.J., Tolhis B., Splinter E., Nijmeijer R., Grosveld F. and de Laat W. (2003). The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat. Genet.* 35, 190-194.

Park J.H., Cosgrove M.S., Youngman E., Wolberger C., Boeke J.D. (2002). A core nucleosome surface crucial for transcriptional silencing. *Nat Genet* 32:273-279.

Paul J. (1972). General theory of chromosome structure and gene activation in eukaryotes. *Nature.* 1972 Aug 25;238(5365):444-6.

Paulson J.R. and Laemmli U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817–828

Pennings S., Meersseman G., Bradbury E.M. (1991). Mobility of positioned nucleosomes on 5 S rDNA. *J Mol Biol* 220:101-110.

Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L., Bruggeman S.W.M., Solovei I., Brugman W., Gräf S., Flicek P., Kerkhoven R.M., van Lohuizen M., Reinders M., Wessels L. and van Stensel, B. (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol. Cell* 38, 603-613.

Raja S.J., Charapitsa I., Conrad T., Vaquerizas J.M., Gebhardt P., Holz H., Kadlec J., Fraterman S., Luscombe N.M., Akhtar A. (2010). The nonspecific lethal complex is a transcriptional regulator in *Drosophila*. *Mol Cell.* 2010 Jun 25;38(6):827-41. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.021.

Rasch E.M. (1970). DNA cytophotometry of salivary gland nuclei and other tissue systems in dipteran larvae, in *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (Wied, G. L. and Bahr, G. F., eds.), Academic, New York, vol. 2, pp. 357–397.

Rath U., Ding Y, Deng H., Qi H., Bao X., Zhang W., Girton J. Johansen J. and Johansen, K.M. (2006). The chromodomain protein, chromator, interacts with JIL-1 kinase and regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *J. Cell Sci.* 119, 2332-2341.

Redon C., Pilch D., Rogakou E., Sedelnikova O., Newrock K., Bonner W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12:162-169.

Roberge M. and Gasser S.M. (1992). DNA loops: structural and functional properties of scaffold-attached regions. *Mol Microbiol.* 1992 Feb;6(4):419-23.

Roth S.Y., Denu J.M., Allis C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*

Ruthenburg A.J., Li H., Milne T.A., Dewell S., McGinty R.K., Yuen M., Ueberheide B., Dou Y., Muir T.W., Patel D.J. et al. (2011). Recognition of a mononucleosomal histone modification pattern by BPTF via multivalent interactions. *Cell*, 145, 692–706.



Rykowski M.C., Parmelee S.J., Agard D.A. and Sedat, J.W. (1988). Precise determination of the molecular limits of a polytene chromosome band: regulatory sequences for the Notch gene are in the interband. *Cell* 54, 461-472.

Saura A.O., Heino T.I. and Sorsa V. (1996). Electron micrograph map of the *Drosophila melanogaster* polytene chromosome 3R divisions 91 through 100. *Hereditas* 124 71-90.

Schaeffer S.W., Bhutkar A., McAllister B.F., Matsuda M., Matzkin L.M., O'Grady P.M., Rohde C., Valente V.L., Aguadé M., Anderson W.W., Edwards K., Garcia A.C., Goodman J., Hartigan J., Kataoka E., Lapoint R.T., Lozovsky E.R., Machado C.A., Noor M.A., Papacait M., Reed L.K., Richards S., Rieger T.T., Russo S.M., Sato H., Segarra C., Smith D.R., Smith T.F., Strelets V., Tobari Y.N., Tomimura Y., Wasserman M., Watts T., Wilson R., Yoshida K., Markow T.A., Gelbart W.M., Kaufman T.C. (2008). Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Jul*;179(3):1601-55. doi: 10.1534/genetics.107.086074. Epub 2008 Jul 13.

Schalch T., Duda S., Sargent D.F., Richmond T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*. 2005 Jul 7;436(7047):138-41.

Schmitz K.M., Mayer C., Postepska A., Grummt I. (2010). Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev.* 2010 Oct 15;24(20):2264-9. doi: 10.1101/gad.590910.

Schwanbeck R., Xiao H., Wu C. (2004). Spatial contacts and nucleosome step movements induced by the NURF chromatin remodeling complex. *J Biol Chem.* 279(38):39933-41.

Semeshin V.F., Zhimulev I.F., Belyaeva E.S. (1979). Cytogenetic study of the region 9E-10A of *Drosophila melanogaster* X chromosome. I. Morphology of the region and mapping of deletions affecting the band 10A1-2. *Genetika, Moscow* 15(10): 1784--1792.

Semeshin V.F., Demakov S.A., Zhimulev I.F. (1989). Characteristics of structures of *Drosophila* polytene chromosomes formed by transposable DNA fragments. *Genetika.* 1989 Nov;25(11):1968-78.

Semeshin V.F., Demakov S.A., Shloma V.V., Vatolina T.Y., Gortchakov, A.A. and Zhimulev, V.F. (2008). Interbands behave as decompacted units in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Genetica* 132, 267-279.

Sexton T., Bantignies F. and Cavalli G. (2009). Genomic interactions: chromatin loops and gene meeting points in transcriptional regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 849-855.

Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E., Bantignies F., Leblanc B., Hoichman M., Parrinello H., Tanay A., Cavalli G. (2012). Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell.* 148(3):458-72. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.010. Epub 2012 Jan 19.

Simonis M., Klous P., Splinter E., Moshkin Y., Willemsen R., de Wit E., van Steensel B., de Laat W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet.* 2006 Nov;38(11):1348-54. Epub 2006 Oct 8.

Smith A.V. and Orr-Weaver T.L. (1991). The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis: the transition to polyteny. *Development.* 112(4) 997-1008.

Smith M.C.A., Till R. and Smith M.C.M. (2004). Switching the polarity of a bacteriophage integration system. *Molecular Microbiology* 51(6) 1719-1728.

Sorsa M. and Sorsa V. (1967). Electron microscopic observations on interband fibrils in *Drosophila* salivary chromosomes. *Chromosoma* 22(1):32-41.

Sorsa V. (1984). Electron microscopic mapping and ultrastructure of *Drosophila* polytene chromosomes. In: King RC, Akai H (eds) *Insect ultrastructure*, vol. 2. Plenum Press, New York, pp 75–107

Sorsa V., Saura A.O., Heino T.I. (1984). Electron microscopic map of divisions 61, 62 and 63 of the salivary gland 3L chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 90: 177--184.

Spradling A. C. and Rubin G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218(4570) 341-347.

Stark W.M., Boocock M.R., Sherratt D.J. (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* 1992 Dec;8(12):432-9.

Stoll S.M., Ginsburg D.S., Calos M.P. (2002). Phage TP901-1 site-specific integrase functions in human cells. *Bacteriol.* 2002 Jul;184(13):3657-63.

Strahl B.D. and Allis C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765) 41-45.

Strick R., Strissel P.L., Gavrilov K., Levi-Setti R. (2001). Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J Cell Biol.* 2001 Dec 10;155(6):899-910. Epub 2001 Dec 10.

Subirana J.A., Messeguer X. (2009). The most frequent short sequences in non-coding DNA. *Nucleic Acids Res.* 2010 Mar;38(4):1172-81. doi: 10.1093/nar/gkp1094. Epub 2009 Dec 4.

Swift H. (1962). Nucleic acids and cell morphology in Dipteran salivary glands. In *The Molecular Control of Cellular activity*, J. M. Allen, ed. (New York: McGraw). pp. 73-125.

Thorpe H.M. and Smith M.C. (1998). In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 12;95(10):5505-10.

Thorpe H.M., Wilson S.E., Smith M.C. (2000). Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage  $\phi$ C31. *Mol Microbiol.* 2000 Oct;38(2):232-41.

Thyagarajan B., Olivares E.C., Hollis R.P., Ginsburg D.S., Calos M.P. (2001). Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage  $\phi$ C31 integrase. *Mol Cell Biol.* 2001 Jun;21(12):3926-34.

Tolhuis B., Palstra R.J., Splinter E., Grosveld F. and de Laat W. (2002). Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol. Cell* 10, 1453-1465.

Trojer P. and Reinberg D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell.* 2007 Oct 12;28(1):1-13.

Turner B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays.* 2000 Sep;22(9):836-45.

Valls E., Sánchez-Molina S., Martínez-Balbás M.A. (2005). Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis. *J Biol Chem.* 2005 Dec 30;280(52):42592-600. Epub 2005 Sep 30.

Van Bortle K., Nichols M.H., Li L., Ong C.T., Takenaka N., Qin Z.S., Corces V.G. (2014). Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome Biol.* 15(6):R82. doi: 10.1186/gb-2014-15-5-r82.

Van Bortle K. and Corces V.G. (2012). Nuclear organization and genome function. *Ann Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 163-187.

Van Holde E. (1988). *Histon modifications in chromatin*. Springer Verlag, New York pp. 111-148P.

Van Holde K.E., Shaw B.R., Lohr D., Herman T.M. and Kovacic R.T. (1975). Organization and expression of the eukaryotic genome. In *Tenth FEBS Meeting*, G. Bernardi and F. Gros, eds. (Amsterdam: North Holland/American Elsevier), pp. 57-72.

Vatolina T.Y., Bolyreva L.V., Demakova O.V., Demakov S.A., Kokoza E.B., Semeshin V.F., Babenko V.N., Goncharov F.P., Belyaeva E.S. and Zhimulev I.F. (2011). Identical functional organization of non-polytene and polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. PLoS one 6, e25960.

Vazquez J. and Schedl P. (2000). Deletion of an insulator element by the mutation facet-strawberry in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 155(3):1297-311.

Vogelmann J., Le Gall A., Dejardin S., Allemand F., Gamot A., Labesse G., Cuvier O., Nègre N., Cohen-Gonsaud M., Margeat E., Nöhlmann M. (2014). Chromatin insulator factors involved in long-range DNA interactions and their role in the folding of the *Drosophila* genome. PLoS Genet. 2014 Aug 28;10(8):e1004544. doi: 10.1371/journal.pgen.1004544. eCollection 2014.

Vogelmann J., Valeri A., Guillou E., Cuvier O., Nöhlmann M. (2011). Roles of chromatin insulator proteins in higher-order chromatin organization and transcription regulation. Nucleus. 2011 Sep-Oct;2(5):358-69. doi: <http://dx.doi.org/10.4161/nucl.2.5.17860>. Epub 2011 Sep 1.

Wang C., Cai W., Li Y., Deng H., Bao X., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. (2011). The epigenetic H3S10 phosphorylation mark is required for counteracting heterochromatic spreading and gene silencing in *Drosophila melanogaster*. J Cell Sci. 2011 Dec 15;124(Pt 24):4309-17. doi: 10.1242/jcs.092585.

Wang C., Cai W., Li Y., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. (2012). H3S10 phosphorylation by the JIL-1 kinase regulates H3K9 dimethylation and gene expression at the white locus in *Drosophila*. Fly (Austin). 2012 Apr-Jun;6(2):93-7. doi: 10.4161/fly.20029. Epub 2012 Apr 1.

Wang C., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. (2011). A balance between euchromatic (JIL-1) and heterochromatic [SU(var)2-5 and SU(var)3-9] factors regulates position-effect variegation in *Drosophila*. Genetics. 2011 Jul;188(3):745-8. doi: 10.1534/genetics.111.129353. Epub 2011 Apr 21.

Wang Y., Zhang W., Ye J., Johansen J., Johansen K.M. (2001). The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. Cell 105, 433-443.

Welshons W.J. and Keppy D.O. (1975). Intragenic deletions and salivary band relationships in *Drosophila*. Genetics. 1975 May;80(1):143-55.

West A.G., Gaszner M. und Felsenfeld G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. Genes and Development 16:271-288.

Woodcock C.L. and Ghosh R.P. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 May;2(5):a000596. doi: 10.1101/cshperspect.a000596. Epub 2010 Apr 7.

Wysocka J., Swigut T., Xiao H., Milne T.A., Kwon S.Y., Landry J., Kauer M., Tackett A.J., Chait B.T., Badenhorst P., Wu C., Allis C.D. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. Nature. 2006 Jul 6;442(7098):86-90. Epub 2006 May 21.

Zhang W., Deng H., Bao X., Lerach S., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. (2006). The JIL-1 histone H3S10 kinase regulates dimethyl H3K9 modifications and heterochromatic spreading in *Drosophila*. Development. 2006 Jan;133(2):229-35. Epub 2005 Dec 8.

Zhao H. and Dean A. (2004). An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. Nucleic Acids Res. 2004 Sep 15;32(16):4903-19. Print 2004.

Zhao Z., Tavoosidana G., Sjölander M., Göndör A., Mariano P., Wang S., Kanduri C., Lezcano M., Sandhu K.S., Singh U., Pant V., Tiwari V., Kurukuti S., Ohlsson R. (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. Nat Genet. 2006 Nov;38(11):1341-7. Epub 2006 Oct 8.

Zhao K., Hart C.M. and Laemmli U.K. (1995). Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. Cell 81, 879-889.

Zhimulev I.F. (1994). Morphology and structure of polytene chromosomes. *Adv Genet* 34:1–497.

Zhimulev I.F. (1999). Genetic organization of polytene chromosomes. *Adv Genet.* 1999;39:1-589.

Zhimulev I.F., Zykova T.Y., Goncharov F.P., Khoroshko V.A., Demakova O.V., Semeshin V.F., Pokholkova G.V., Boldyreva L.V., Demidova D.S., Babenko V.N., Demakov S.A., Belyaeva E.S. (2014). Genetic organization of interphase chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 9(7):e101631. doi: 10.1371/journal.pone.0101631. eCollection 2014.

Zhimulev I.F. (1996). Morphology and Structure of Polytene Chromosomes. *Advances in Genetics*, Vol 34, 1-484

Zhimulev I.F. and Koryakov D.E. (2009). Polytene Chromosomes. eLS.

Zimin P.I., Gorchakov A.A., Demakov S.A., Zhimulev I.F. (2004). Creation of a new construct for cloning DNA and modeling the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *Mol Biol (Mosk).* 2004 Mar-Apr;38(2):250-5.

## 7. Anhang

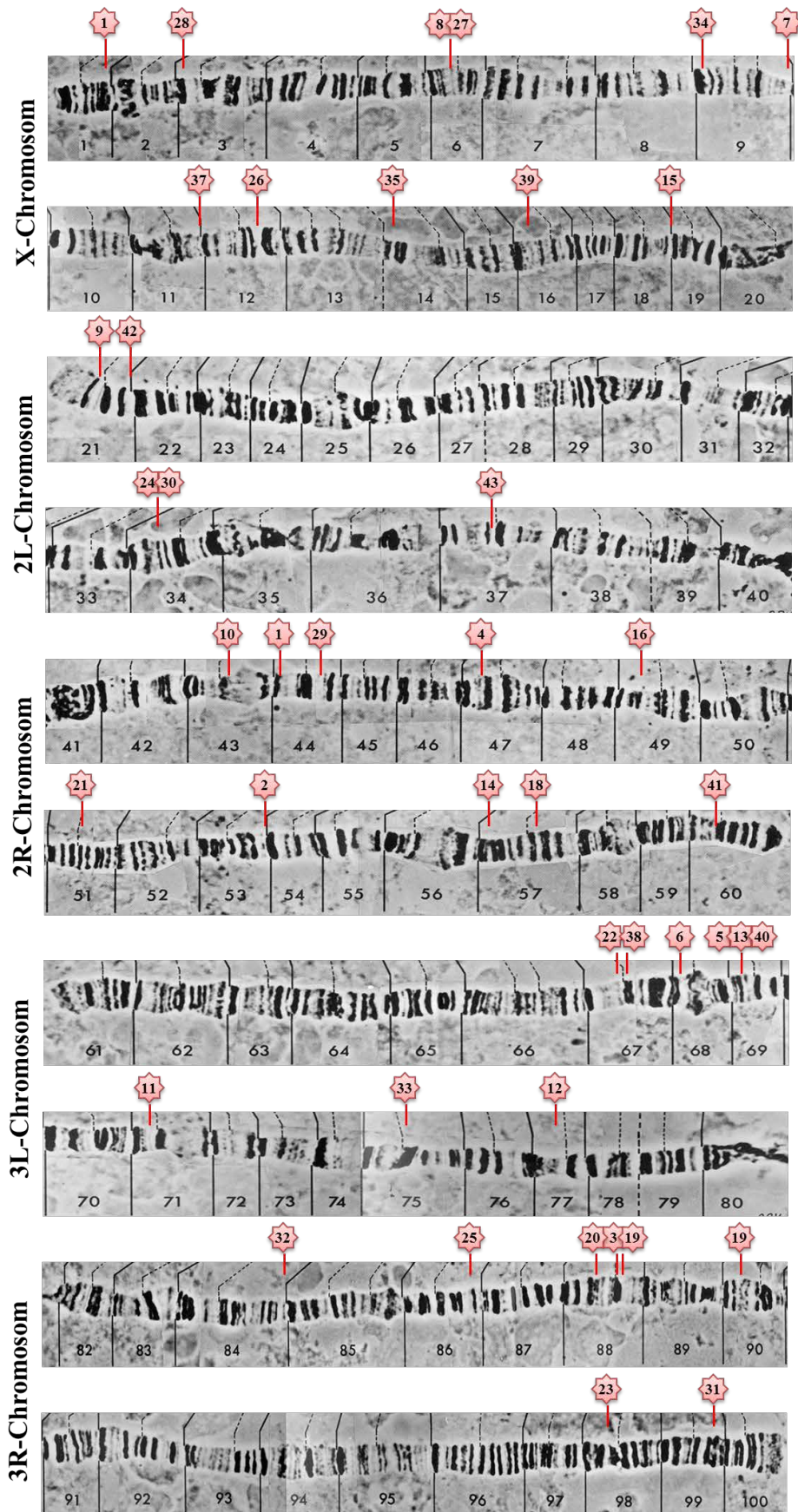


Abb. 17: Polyäne Chromosomen mit markierten P-Element Insertionen.

Tabelle 1: Anzahl der positiven Rekombinanten und Rekombinationsfrequenz der einzelnen Interbanden- und Kontrollkonstrukte

Konstrukt	pos. Rekombination	Frequenz
pattP61Cdp	6/162	3,7%
pattP61CΔp	2/60	3,33%
pattP61CΔd	4/78	5,13%
pattP61CΔP1	3/105	2,86%
pattP61CΔP2	4/65	6,15%
pattP61CΔP1+2	3/49	6,12%
pattP3C	2/51	3,92%
pattP3C(fa(swb))	2/75	2,66%
pattPNw	2/54	3,70%
pattPempty	1/32	3,13%

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

Act Actin

attB/P attachment B/P Seite

BEAF32 Boundary Element associated Factor of 32 kD

BNT Biotin-Nick-Translation

bp Basenpaare

cDNA (m)RNA-komplementäre DNA

ChIP Chromatin-Immun-Präzipitation

chip DNA-Microarray

Chriz Chromodomain protein interacting with Z4

co Kontrolle

CP190 Centrosomal protein 190

Cyo Curly (Flügelphänotyp)

dCTCF CCCTC-Binding factor

DHS DNase 1 hypersensitive Stellen

DNA 2'-Desoxyribonukleinsäure

dNTP 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat

dp distal und proximal

E.coli Escherichia coli

fa(swb) facet strawberry

FISH Fluoreszenz in situ Hybridisierung

GFP Green Fluorescent Protein

IgG Immunglobulin G

kb Kilobasenpaare

MAR Matrix associated Region

µl, ml, l Mikroliter, Milliliter, Liter

N Notch

nm, µm, mm Nanometer, Mikrometer, Millimeter

NP40 Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol

Nu Nukleotid

P1 Promoter 1

P2 Promoter 2

PBS	phosphatgepuferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEV	Positions-Effekt-Variation
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
S2	Schneider 2 Zellen
SAR	Scaffold associated Region
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (sodium sodium citrate)
Tft	Tufted (Borstenphänotyp)
TR	Texasred (Floureszenzfarbstoff)
TSS	Transkriptionsstartseite
UAS	upstream activating sequence
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolette
w	white
WT	Wildtyp



## Danksagung

Mein größter Dank gebührt meinem Betreuer Herrn. Prof. Dr. Harald Saumweber, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Auch möchte ich mich bei ihm bedanken für seine konstruktiven Diskussionen, Ratschläge und Ideen, welche von unschätzbaren Wert für diese Arbeit waren und mich stets durch meine PhD Zeit begleitet haben.

Ein weiterer Dank richtet sich an alle ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Zytogenetik für die angenehme Atmosphäre und Zusammenarbeit. Speziell danke ich hierbei Dandan Zhao, Alexander Glotov und Jennifer Jammrath für viele hilfreiche Diskussionen und Ratschläge sowie Einführungen in spezielle Methoden.

Auch möchte ich mich bei meiner ganzen Familie für ihre Unterstützung während meiner gesamten PhD Zeit bedanken.

## Publikationsliste

**Zielke T., Saumweber H.** (2014). Dissection of open chromatin domain formation by site-specific recombination in *Drosophila*. *J Cell Sci.* 127(Pt 10):2365-75. doi: 10.1242/jcs. 147546. Epub 2014 Mar 17.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thomas Zielke, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den .....

.....

Thomas Zielke